

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет Біомедичної інженерії

Кафедра Біомедичної інженерії

«На правах рукопису»
УДК 576.08

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
_____ Владислав ШЛИКОВ
«__» _____ 20__ р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

за освітньо-професійною програмою «Медична інженерія»

зі спеціальності 163 «Біомедична інженерія»

**на тему: «Прилад для підготовки міоцитів для дослідження експресії
каналу Piezo1 методом ПЛР»**

Виконав:

студент VI курсу, групи БМ-91мп

Умаров Денис Васильович _____

Керівник:

доц. каф. БМІ, к.б.н.,

Беспалова Олена Ярославівна _____

Рецензент:

проф., д.пед.н.

Вихляєв Юрій Миколайович _____

Нормоконтролер:

Інженер 1 категорії

Андрєєв Петро Іванович _____

Засвідчую, що у цій магістерській
дисертації немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Студент _____

Київ – 2020

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет Біомедичної інженерії
Кафедра Біомедичної інженерії

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Спеціальність – 163 «Біомедична інженерія»

Освітньо-професійна програма «Медична інженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Владислав ШЛИКОВ

«__» _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ
на магістерську дисертацію студенту

Умаров Денис Васильович

1. Тема дисертації «Прилад для підготовки міоцитів для дослідження каналу Piezo1 методом ПЛР», науковий керівник дисертації Беспалова Олена Ярославівна, доц. каф. БМІ, к.б.н., затверджені наказом по університету від «11» листопада 2020 р. № 3282-с
2. Термін подання студентом дисертації - 11.12.2020
3. Об'єкт дослідження – гладенькі міоцити сечового міхура щура.
4. Вихідні дані - загальна характеристика механочутливості в організмі; відомості про електрофізіологічні методи досліджень; характеристика механочутливих іонних каналів; відомості про методи ПЛР, кальцієвої візуалізації.
5. Перелік завдань, які потрібно розробити - провести огляд літературних джерел, що описують дослідження клітин фізіологічними методами; проаналізувати літературні джерела, що стосуються досліджень механочутливості тканин сечового міхура; провести електрофізіологічні дослідження із гідродинамічної активацією клітин, провести кальциметричні

досліди із активацією клітин дотиком; провести дослідження із застосуванням методу ПЛР та розробити прилад для забезпечення проведення Single-cell-ПЛР.

6. Орієнтовний перелік графічного (ілюстративного) матеріалу – презентація у слайдах.

7. Орієнтовний перелік публікацій – постер; виступ на конференції Біофізичного товариства України із статтею.

8. Дата видачі завдання - 26.10.2020

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Аналіз літературних джерел	Вересень 2020	
2	Розробка технічного завдання	Вересень 2020	
3	Розробка конструкції приладу	Жовтень 2020	
4	Оформлення розділу з розробки стартап-проекту	Листопад 2020	
5	Оформлення МД	Грудень 2020	
6	Отримання рецензії та відгуку	Грудень 2020	
7	Здача роботи на нормоконтроль	Грудень 2020	
8	Захист МД	Грудень 2020	

Студент

Денис УМАРОВ

Науковий керівник

Олена БЕСПАЛОВА

РЕФЕРАТ

Тема магістерської дисертації: «Прилад для підготовки міоцитів для дослідження каналу Piezo1 методом ПЛР».

Обсяг звіту становить 105 сторінок, міститься 28 ілюстрацій.

Загалом опрацьовано 55 джерел.

Актуальність роботи: поширеність каналу Piezo1 в різних типах тканин та його участь у механочутливості є актуальним питанням. Дослідження Piezo1 та його локалізації в організмі відіграють важливу роль у подальшому розумінні багатьох життєвих процесів. Відділ НМФ Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця отримав грант на дослідження йонних каналів родин Piezo та TRPV.

Експериментальна частина практики проводилася у Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, відділ нервово-м'язової фізіології, лабораторія молекулярної фізіології рецепторів та йонних каналів.

Мета даної роботи: дослідити експресію та функції каналу Piezo1 у гладеньких міоцитах детрузора щура.

Для досягнення мети сформовані такі завдання:

1. Провести огляд літературних джерел, що описують дослідження клітин фізіологічними методами; проаналізувати літературні джерела, що стосуються досліджень механочутливості тканин сечового міхура.

2. Провести електрофізіологічні дослідження із гідродинамічної активацією клітин, провести кальциметричні дослідження із активацією клітин дотиком.

3. Провести дослідження із застосуванням методу ПЛР та розробити прилад для забезпечення проведення Single-cell-ПЛР.

Ключові слова: механочутливість, механочутливість клітин детрузора, електрофізіологічні методи дослідження, Piezo1, Piezo1 у ссавців.

ABSTRACT

Subject of master's dissertation is «Device for preparation of myocytes for the study of Piezo1 channel expression by PCR»

The volume of the report is 105 pages, contains 28 illustrations.

In total, 55 sources have been processed.

Relevance of the work: the prevalence of the Piezo1 channel in different types of tissues and its participation in mechanical sensitivity is a topical issue. Studies of Piezo1 and its localization in the body play an important role in the further understanding of many life processes. Department of NMP, Institute of Physiology. O.O. Bogomolets received a grant to study the ion channels of the Piezo and TRPV families.

The experimental part of the practice was conducted at the Institute of Physiology. O.O. Bogomolets NAS of Ukraine, Department of Neuromuscular Physiology, Laboratory of Molecular Physiology of Receptors and Ion Channels.

The aim of this work: to investigate the expression and function of the Piezo1 channel in smooth myocytes of the rat detrusor.

To achieve this goal, the following tasks are formed:

1. Conduct a review of literature sources describing the study of cells by physiological methods; analyze literature sources related to studies of mechanical sensitivity of bladder tissues.

2. To carry out electrophysiological experiments with hydrodynamic activation of cells, to carry out calcimetric experiments with activation of cells by touch.

3. Carry out research using the PCR method and develop a device to ensure single-cell PCR.

Key words: mechanical sensitivity, mechanical sensitivity of detrusor cells, electrophysiological research methods, Piezo1, Piezo1 in mammals.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА	9
1.1 Електрофізіологічні дослідження	9
1.2 Метод ПЛР	25
1.3 Метод кальцієвої візуалізації	43
Висновок до розділу 1	59
РОЗДІЛ 2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА	61
1.1 Об'єкт, матеріали та методи дослідження	61
1.2 Дослідження методом Петч-Клемп	63
1.3 Візуалізація кальцієвої сигналізації	69
1.4 Полімеразна ланцюгова реакція для дослідження експресії мРНК Piezo1	72
1.5 Розробка приладу для проведення Single-Cell-PCR	74
Висновок до розділу 2	83
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЕКТУ	84
3.1 Резюме проекту	84
3.2 Організація проекту	85
3.3 Ключові види діяльності проекту	85
3.4 Ціннісні пропозиції та споживачі	87
3.5 Взаємовідносини зі споживачами та канали збуту	91
3.6 Обґрунтування ресурсів та витрат проекту	92
3.7 Грошовий потік та оцінка вартості проекту	94
Висновки до розділу 3	96
ВИСНОВКИ	97
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	98

ВСТУП

Темою магістерської дисертації є: «Прилад для підготовки міоцитів для дослідження каналу Piezo1 методом ПЛР».

Механічна чутливість на клітинному рівні забезпечує відчуття вібрацій, дотику, розтягнення або тиску твердих структур або рідин на клітинну мембрану, що в свою чергу дозволяє відповідно реагувати функціонування органів або цілих систем організму у відповідь на ці фактори впливу. Нещодавно була відкрита родина йонних каналів Piezo. Ці канали є одними із основних механочутливих молекулярних рецепторів ссавців. Серед них - Piezo1 - катіонний неселективний канал, що активується у відповідь на розтягнення, переміщення клітини, вплив на мембрану тиском або потоком рідини.

Актуальність роботи: поширеність каналу Piezo1 в різних типах тканин та його участь у механочутливості є актуальним питанням. Дослідження Piezo1 та його локалізації в організмі відіграють важливу роль у подальшому розумінні багатьох життєвих процесів. Відділ НМФ Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця отримав грант на дослідження йонних каналів родин Piezo та TRPV.

Експериментальна частина практики проводилася у Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, відділ нервово-м'язової фізіології, лабораторія молекулярної фізіології рецепторів та йонних каналів.

Мета даної роботи: дослідити експресію та функції каналу Piezo1 у гладеньких міоцитах детрузора щура.

Для досягнення мети сформовані такі завдання:

1. Провести огляд літературних джерел, що описують дослідження клітин фізіологічними методами; проаналізувати літературні джерела, що стосуються досліджень механочутливості тканин сечового міхура.

2. Провести електрофізіологічні досліді із гідродинамічної активацією клітин, провести кальциметричні досліді із активацією клітин дотиком.

3. Провести дослідження із застосуванням методу ПЛР та розробити прилад для забезпечення проведення Single-cell-ПЛР.

РОЗДІЛ 1

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1.1 Електрофізіологічні дослідження

Справжній прорив у дослідженнях мембран клітин викликав так званий метод patch-clamp, який був створений на основі методу внутрішньоклітинного діалізу клітин, розробленого в 1976 р в Інституті фізіології ім. А.А. Богомольця (Київ) під керівництвом акад. П.Г. Костюка [1]. Метод patch-clamp запропонували в 1976 р Е. Neher і В. Sakmann [2]. І хоча в його основі лежав принцип дослідження клітин методом діалізу, запропонований метод відрізнявся рядом технічних модифікацій і був вкрай складним. Однак уже в 1981 р, після публікацій О.Р. Hamill і соавт. [3], цей метод перетворився в загальнодоступний, що дозволяє проводити будь-які вимірювання на клітинному рівні. В даний час всі електрофізіологічні дослідження мембран клітин проводять за допомогою даного методу.

Метод patch-clamp дозволяє реєструвати на ізольованих клітинах їх потенціали, струми або поодинокі іонні канали за допомогою спеціальної скляної піпетки (patch-піпетки), що нагадує мікроелектрод, який має опір від 2 до 10 МОм в залежності від типу досліджуваних клітин. Крім того, метод дозволяє реєструвати іонні канали з ізольованого шматочка мембрани, який може бути розташований по відношенню до отвору піпетки або зовнішньою, або внутрішньою стороною.

На рис. 1.1 показані мікроелектрод і patch-піпетка і продемонстровані їх основні відмінності.

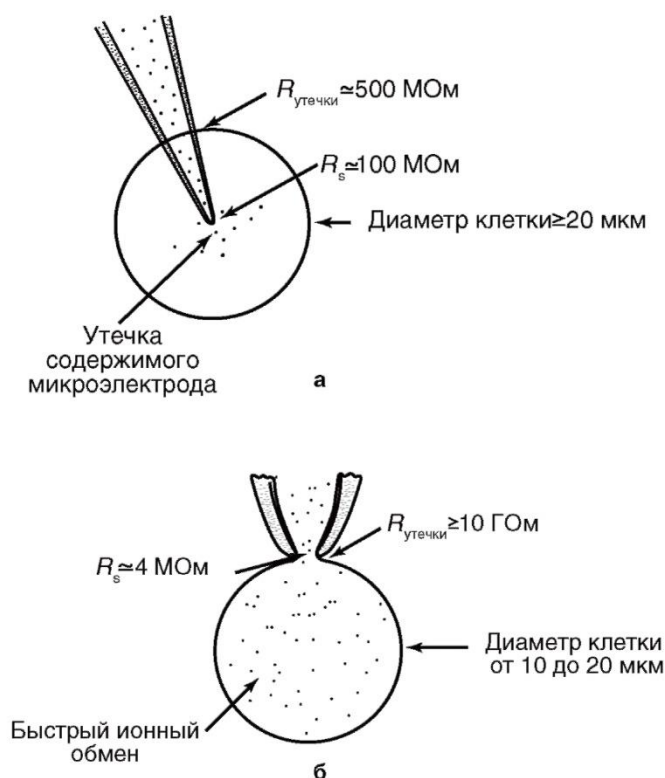


Рисунок 1.1 – Элементы петч-системы

У порівнянні з методами мікроелектродної техніки і класичної фіксації потенціалу застосування піпетки має ряд позитивних моментів. По-перше, технічна підтримка методу дозволяє за допомогою одного приладу досліджувати клітини як в режимі фіксації струму, так і в режимі фіксації потенціалу. По-друге, метод patch-clamp дозволяє вивчати дрібні клітини без істотного пошкодження їх мембран, тоді як навіть один мікроелектрод, а тим більше - два, істотно пошкоджують мембрану. Далі, опір витоку мікроелектрод-мембрана не перевищує 500 МОм, а при використанні методу patch-clamp і, відповідно, patch-піпетки - більше 10 ГОм, що істотно впливає на якість реєстрації. Нарешті, мікроелектроди мають опір, що досягає 100 МОм, а patch-піпетки - від 2 до 10 МОм, що дозволяє не тільки якісно реєструвати потенціали і струми клітини, але і вводити в клітини без особливих проблем.

Для досліджень методом patch-clamp існує кілька практично однакових приладів, наприклад BioLigic, Axopatch, List Elektronik, які

дозволяють в режимі current-clamp (фіксація струму) реєструвати потенціали клітин і здійснювати їх електричне збудження, а в режимі voltage-clamp (фіксація потенціалу) - вимірювати сумарні іонні струми клітини або струми через поодинокі іонні канали. Ці прилади комплектуються аналогово-цифровими перетворювачами, які виконані або як окремі прилади, або як карти, що встановлюються в персональний комп'ютер. Крім того, в комплект поставки включені: програма для реєстрації процесів у всіх режимах роботи і програма для обробки зареєстрованих процесів.

На рис. 1.2 показані різні конфігурації patch-clamp по відношенню до клітини або фрагменту її мембрани. Спочатку піпетку підводять впритул до мембрани ізольованою клітини і створюють в ній невеликий негативний тиск. Це призводить до того, що мембрана щільно закупорює отвір піпетки, і формується високоомний контакт - конфігурація cell-attached або, інакше, перехід піпетка-мембрана з опором витоку понад 1 ГОм (так званий giga-seal). Після нормалізації тиску в піпетці конфігурація cell-attached близька до фізіологічної ситуації, оскільки зона мембрани, захоплена піпеткою, з внутрішньої сторони контактує з внутрішньоклітинною рідиною, а з зовнішнього боку - зі стандартним позаклітинним розчином, яким заповнюють patch-піпетку. Ця конфігурація, з одного боку, дозволяє реєструвати поодинокі іонні канали під піпеткою, а з іншого - є проміжною для інших конфігурацій. Вона дозволяє вивчати на одиночному каналі роль вторинних месенджерів, які включаються через рецептори плазматичної мембрани.

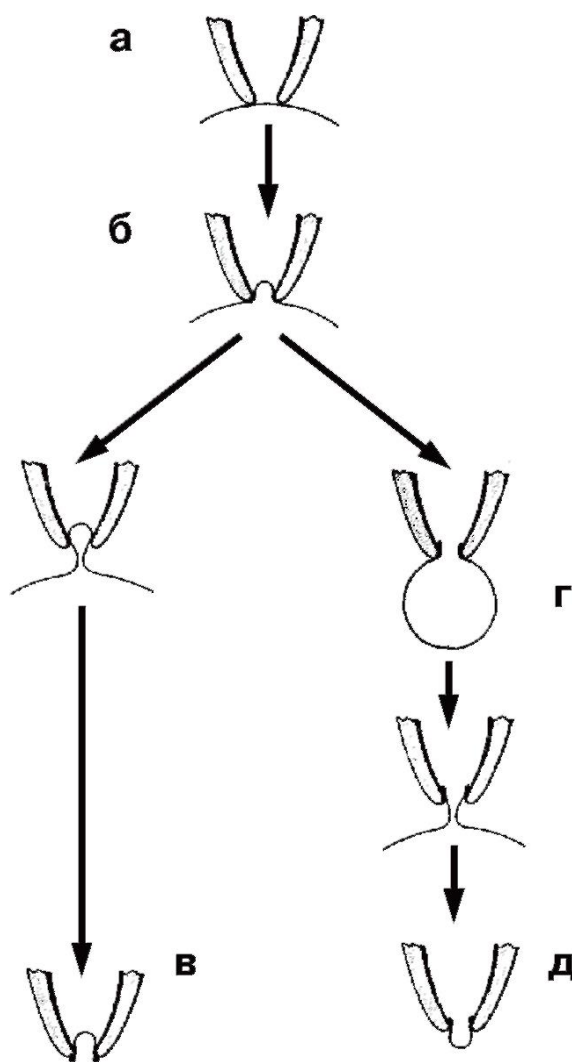


Рисунок 1.2 – Конфігурації методу

Конфігурація cell-attached дозволяє сформувати іншу конфігурацію, так звану inside-out patch. До її утворення призводить різке відривання піпетки від клітини, причому giga-seal не змінюється. У цьому випадку на піпетці знаходиться лише фрагмент мембрани (patch), внутрішня сторона якої дивиться в розчин, що омиває перфузійну камеру, а зовнішня контактує з вмістом піпетки. Дану конфігурацію використовують для вивчення вкладу з'єднань цитоплазми в каналну активність.

Конфігурація cell-attached дозволяє двома шляхами (в залежності від завдань дослідника) сформувати конфігурацію, звану whole-cell. В одному випадку для її отримання в піпетку необхідно різко і одномоментно подати невеликий негативний тиск, що розриває мембрану

під піпеткою і утворює низькоомний опір між внутрішнім середовищем клітини і розчином в піпетці. При цьому в мембрані виникає дірка, величина якої дозволяє здійснювати обмін іонів і різних з'єднань між піпеткою і цитоплазмою. В іншому випадку низькоомний опір між внутрішнім середовищем клітини і розчином в піпетці формується завдяки впливу сполук, що знаходяться в піпетці і викликають утворення в мембрані пір, проникних для іонів, але не для молекул. Це перфоративний (perforated) patch. Антибіотики ністатин (nystatin) і амфотерицин Б (amphotericin B) використовують в піпеточних розчинах, щоб утворити специфічні пори на ділянці мембрани під піпеткою. Вони пропускають через мембрану моновалентні катіони і аніони. Ще одне з'єднання - граміцидин (gramicidin) - допомагає формувати канали, проникні тільки для моновалентних катіонів. Ця методика дозволяє досліджувати іонні струми, що протікають через мембрану, ідентифікувати і виокремити їх.

Конфігурація whole-cell дозволяє сформувати ще один варіант конфігурації - outside-out patch. Повільне відтягування піпетки від клітини змушує мембрану розтягуватися до тих пір, поки вона не відійде від клітини і не з'єднається. Тепер її внутрішня частина буде контактувати з розчином в піпетці, а зовнішня - з омиваючим розчином в перфузійній камері. Дану конфігурацію застосовують для вивчення вкладу з'єднань зовнішнього середовища клітини в активність поодиноких каналів.

При будь-яких конфігураціях patch-clamp використовують patch-піпетки, основна відмінність між якими в залежності від завдань експериментатора полягає в їх опорі, тобто в діаметрі кінчика patch-піпетки. Patch-піпетки, кінчик яких представлений на рис. 1.3, зазвичай витягають зі стандартних комерційних капілярів зовнішнім діаметром 2 мм, що містять один скляний філамент (наприклад, GB200F-8P; Science Products GmbH).

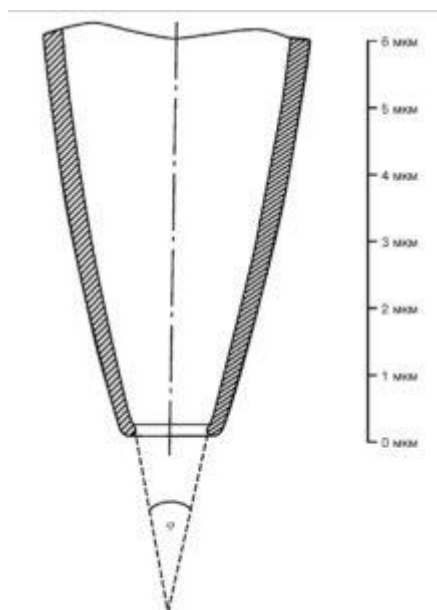


Рисунок 1.3 – Зображення піпетки

Patch-піпетки виготовляють витягуванням в дві стадії, як це запропоновано Хеміллом і співавт. [4]. На першому етапі витягування patch-піпетки капіляр повинен набути потоншення діаметром 200-400 мкм в місці розташування спіралі (в місці розігріву). На другому етапі діаметр зменшується до 1-2 мкм, і в результаті розриву стоншення виходять дві patch-піпетки. Принцип витягування patch-піпеток не є критичним для подальшої роботи, тому придатні багато типів приладів. Вони повинні мати невелику силу ривка, пристосування для зупинки на першому етапі витягування і плавний точний режим нагріву спіралі. У багатьох лабораторіях застосовують так званий КОПФ (David Kopf Instruments, USA). Ця установка має фіксований зверху і рухливий знизу тримачі для капіляра, тому дві отримані patch-піпетки не є ідентичними; зазвичай використовують тільки нижню patch-піпетку (при наявності горизонтальної програмованої установки можна використовувати обидві отримані піпетки, які мають після витяжки однакові параметри). Після першого етапу відбувається автоматичне відключення нагріву спіралі. Для реалізації другого етапу знову включають нагрів спіралі, що

знаходиться в центрі стоншення, і після розігріву скла в результаті розриву стоншення виходять дві patch-піпетки.

Багато дослідників зазвичай оплавляють отримані patch-піпетки. Patch-піпетку кріплять на окремому мікроманіпуляторі так, щоб нагрівальний елемент і patch-піпетку можна було переміщати незалежно один від одного. При оплавленні кінчик patch-піпетки витримують протягом декількох секунд на відстані 2-10 мкм від скляного покриття нагрівального елемента. Зазвичай у неоплавленого електрода добре видно отвір кінчика. При оплавленні просвіт стає невидимим. Розмір кінчика піпетки в цьому випадку оцінюють шляхом пропускання повітря через patch-піпетку, кінчик якої занурений в метанол. Для цього піпетку з'єднують за допомогою поліетиленової трубочки довжиною 10 см зі шприцом об'ємом 10 мл. Якщо до patch-піпетки докласти тиск, то з її кінчика почнуть виходити бульбашки повітря, як тільки величина тиску перевищить поверхневий натяг на межі фаз «повітря-метанол». Оскільки поверхневий натяг обернено пропорційно радіусу кривизни, з кінчиків з великим діаметром бульбашки повітря будуть виходити при меншому тиску. Граничний тиск назвали bubbles number (бульбашкове число). Для його визначення поршень шприца встановлюють початково на позначці 10 мл і помічають його положення в момент появи пухирців. Ця величина в кубічних сантиметрах і є bubbles number. Воно дорівнює числу 10, поділеному на пороговий тиск в атмосферах. Хоча бульбашкове число є лише оціночним параметром і залежить від геометрії кінчика, цей спосіб вимірювання розмірів кінчика більш точний, ніж метод, заснований на визначенні опору, і дозволяє оцінювати розміри до заповнення електродів електролітом. За приблизними оцінками, електроди з bubbles number 3-3,5 прийнятні для більшості типів реєстрації, з 4-4,5 - для реєстрації на цілій клітині і з 1,5-2,5 - при роботі з такими малими клітинами, як еритроцити.

Для того щоб отримати ті чи інші конфігурації, необхідно перш за все створити конфігурацію cell-attached. Після приєднання піпетки до тримача за допомогою шприца подають невеликий позитивний тиск (приблизно 0,01 мл) і вводять patch-піпетку в перфузійну камеру. При цьому включається програма, яка створює прямокутні імпульси електричного струму негативної полярності амплітудою не більше -7 мВ і частотою 1 Гц при посиленні $\times 2$. Підвівши patch-піпетку до клітки, знімають тиск в піпетці і дотикаються до мембрани клітини. При роботі з деякими клітинами, наприклад, з ізольованими з допомогою ферментів клітинами міокарда або клітинами скелетних м'язів, гігаомні контакти іноді формуються спонтанно. При дотику кінчиком піпетки до поверхні клітини високоомний контакт утворюється без підсосу і навіть при невеликому надлишковому тиску в піпетці. Якщо спонтанного формування гігаомного контакту не відбувається, то в шприці на 1 мл, який з'єднаний з patch-піпеткою, створюють невеликий негативний тиск (приблизно 0,2 мл), в результаті чого реєструється підвищення перехідного опору «скло кінчика patch-піпетки - мембрана клітини». Зазвичай протягом 1-1,5 хв цей опір досягає необхідних величин, наприклад, 2-2,5 ГОм для кардіоміоцитів. Якщо цього не відбувається і опір припиняє збільшуватися при величині в діапазоні 500-700 МОм, то шприц можна зняти, і в багатьох випадках збільшення опору відбувається за лічені секунди. Чим більше величина перехідного опору, тим точніше буде здійснюватися подальша реєстрація струму в тій чи іншій конфігурації. Після досягнення величини перехідного опору 200 МОм включають програму, що забезпечує генерацію імпульсів електричного струму з необхідними для експерименту параметрами. Перемикають посилення підсилювача на $\times 10$ (або $\times 20$ при необхідності). При зазначеному посиленні про досягнення необхідного перехідного опору свідчить відсутність прямокутного сигналу на екрані монітора і наявність

емнісних піків, відповідних фронту наростання сигналу (в позитивну область) і фронту падіння сигналу (в негативну область).

Окреме питання пов'язане з розчином, яким заповнюють patch-піпетки. У стандартних мікроелектродних дослідженнях для заповнення мікроелектродів зазвичай використовують 2,5 М розчин KCl. Для patch-піпетки потрібен той розчин, склад якого визначається конкретними завданнями експериментатора.

Розглянемо це питання, наприклад, для patch-піпетки, яка буде використана для створення конфігурації whole-cell у ізольованих кардіоміоцитів. Розчин для такої піпетки матиме прямий зв'язок з внутрішньоклітинним розчином, причому ступінь дифузії іонів і будь-яких з'єднань в клітину буде досить висока через низький опір (тобто великого отвору) patch-піпетки. Якийсь «середній» внутрішньоклітинний розчин кардіоміоцита включає: 15 мМ Na⁺, 145 мМ K⁺, 10-4 мМ Ca²⁺ та інші іони, які зазвичай не враховуються. Дані внутрішньоклітинні концентрації іонів розраховані за вільними концентрацій в цитоплазмі. У той же час розчин для patch-піпеток повинен відповідати певним вимогам, які визначаються тим, що дослідник хоче зареєструвати.

Якщо ж на додаток до реєстрації піку струму, наприклад, кальцієвого, необхідно вивчати його інактивацію, експериментатору слід ввести в піпетку відповідні блокатори калієвих каналів, оскільки присутність тільки іонів Cs⁺ не дасть необхідного ефекту блокування всіх каналів вихідного струму. Якщо при цьому потрібно стежити за внутрішньоклітинним Ca²⁺, то необхідно, щоб в patch-піпетці було фіксоване pCa. Так, при необхідності мати pCa = 6 patch-піпетки повинні містити 4,5 мМ CaCl₂ і 5мМ EGTA. При необхідності мати pCa = 7 patch-піпетки повинні містити 5 μМ EGTA. Для створення pCa = 8 patch-піпетки повинні містити 5мМ BAPTA.

На закінчення слід зазначити, що додавання в patch-піпетку 5мМ Na₂АТР для запобігання run-down каналів не є необхідним. При хорошому виділенні клітин вони можуть «висіти» в конфігурації whole-cell і без Na₂АТР в patch-піпетці до 50 хв без будь-яких змін своєї електрофізіології. Якщо ж клітини «погані», їх електрофізіологічні параметри (наприклад, піковий Ca²⁺ -струм) лінійно змінюються (зменшення пікового Ca²⁺ -струму) протягом 10-15 хв, і це є звичайною загибеллю погано зварених клітин, а експериментатор не може виправдовувати ситуацію настанням run-down, тим більше що в цьому випадку присутність Na₂АТР абсолютно не покращує ситуацію.

Після отримання конфігурації cell-attached здійснюють компенсацію ємності, усуваючи за допомогою регулювання ємнісні піки. Після цього за допомогою шприца різко створюють негативний тиск в patch-піпетці, переміщаючи поршень на 0,3-0,4 мл і тут же знімаючи шприц. Якщо розриву мембрани не відбувається, повторюють процедуру до отримання конфігурації whole-cell.

Використовуваний для вимірювання струмів алгоритм програми включає в себе наступні аспекти. Перш за все, holding potential, або підтримуваний потенціал, встановлюють, виходячи з того, який струм експериментатор збирається реєструвати. Так, для вивчення Na⁺-струму величина holding potential повинна лежати в тих межах, коли Na⁺ -канали практично не активовані або інактивовані; наприклад, для кардіоміоцитів, потенціал спокою яких дорівнює -80 мВ, holding potential повинен бути трохи більше, наприклад -85 мВ. При цьому повинні бути заблоковані Ca²⁺, K⁺ -канали (необхідно зазначити, що заблокувати всі K⁺ -канали досить складно). При вивченні Ca²⁺-струму величина holding potential повинна складати близько -45 мВ, тобто перебувати на тому рівні, коли інактивовані Na⁺ -канали, а Ca²⁺ -канали практично не активовані або інактивовані. При цьому повинні бути заблоковані K⁺ -канали і бажано

(хоча і необов'язково) Na^+ -канали. Амплітуду прямокутного імпульсу електричного струму вибирають на основі відомих вольтамперних характеристик для даного типу каналів. Наприклад, для L-типу Ca^{2+} -каналів характерна максимальна величина струму при амплітуді тестового сигналу від -45 до 0 мВ. Що стосується тривалості тестуючого сигналу, то зазвичай виходять із завдань експерименту. Якщо необхідно вимірювати тільки величину струму по піку, наприклад Ca^{2+} -струм, то тривалість прямокутного імпульсу електричного струму повинна лежати в межах 140-150 мс. Якщо ж необхідно оцінити активацію і інактивацію Ca^{2+} -струму, то тривалість повинна бути значно більшою. Тривалість імпульсу залежить від завдання експерименту, так само як і внутрішньоклітинний розчин.

Загальне правило: тестуючий імпульс повинен бути значно більше тривалості досліджуваного процесу. Іншими словами, якщо дослідника цікавить час активації, то проводять серію експериментів, використовуючи різну тривалість, визначають час активації і подальші досліді проводять, використовуючи імпульси, наприклад, в 3 рази довше. Частота подачі сигналу визначається як завданнями експерименту, так і тривалістю тестуючого імпульсу і часом виходу з інактивації.

Далі в програму повинна бути включена можливість вимірювання вольт-амперної характеристики клітини. Для цього з кроком 10 мВ, а при наближенні до точки перетину осі абсцис з віссю ординат (тобто до нульової точки потенціалу та струму) - з кроком 5 мВ від величини holding potential, повинні бути подані тестуючі імпульси негативної полярності до -100 мВ, після чого подають тестуючі імпульси позитивної полярності до величини +100 мВ.

Нарешті, повинна бути передбачена програма для визначення ємності клітини. Для цього від рівня -80 мВ (або трохи більшого) на клітину подають тестуючий імпульс негативної полярності величиною не

більше 10 мВ (насправді точна величина тестуючого імпульсу не так важлива, хоча зазвичай на клітину подають дійсно 10 мВ; важливо, щоб не активувався жоден струм) і реєструють площа ємнісних піків, відповідних фронту наростання сигналу (в позитивну область) і фронту падіння сигналу (в негативну область), обчислюючи на цій основі ємність клітини. У цьому випадку використовують простий розрахунок, пов'язаний з RC-ланцюжком. Якщо подати досить довгий імпульс, то площа під ємнісним артефактом дорівнює RC при дотриманні двох наближень. Необхідно знехтувати фронтом наростання і вважати спад як моноекспоненціальний.

Якщо імпульс довгий, то струм в кінці імпульсу дає величину $R = U / I$ і, відповідно, можна підрахувати C. Ємність клітини необхідна для нормування величини струму, тобто для отримання значень pA / pF. Таке нормування вкрай важливо, оскільки величина струму залежить від розмірів клітини, визначення яких практично неможливо. Іншими словами, у різних за розміром клітин будуть реєструватися різні за величиною струми, тому проведення статистичного аналізу дуже складно здійснити. Однак, оскільки розміри клітини безпосередньо пов'язані з її ємністю, прийнято здійснювати нормування за величиною ємності.

Ще один спосіб оцінки величини зміни струму від часу - реєстрація так званого time course. Цим методом обробки даних по малюнку можна визначити динаміку зміни пікового струму, а також оцінити вплив тих чи інших сполук на величину струму.

Ще два параметра, що характеризують роботу потенціалактивованих каналів - їх активація і інактивація. Активація потенціалактивованих каналів, яка відбувається тільки під впливом зміни трансмембранного електричного потенціалу, є їх характерною рисою. Особливість Ca^{2+} -струму в порівнянні з Na^{+} -струмом полягає в їх повільному наростанні при зміщенні мембранного потенціалу.

У якій би конфігурації каналні струми не реєстрували, перш за все необхідно розглянути питання про величину фрагмента мембрани, який знаходиться під patch-піпеткою. Це особливо важливо при вивченні реагуючих на зміну тиску механочутливих каналів.

Отже, після спонтанного отримання гігаомного контакту без підсосу при візуальному розгляді кінчика patch-піпетки і поверхні клітинної мембрани при великому збільшенні (x1200) не спостерігається деформації клітинної мембрани під patch-піпеткою. Площа електрично ізольованого піпеткою мембранного фрагмента, мабуть, приблизно дорівнює площі отвору кінчика. Область контакту «мембрана-скло» формується, ймовірно, тільки торцем кінчика patch-піпетки. У цьому випадку площа фрагмента мембрани можна оцінити за значенням опору patch-піпетки до утворення контакту. Однак в більшості випадків контакт формується тільки при невеликому негативному тиску, створюваному всередині піпетки. При цьому частина клітинної мембрани втягується всередину кінчика піпетки, приймаючи Q-подібну форму. Таку деформацію під час встановлення гігаомного контакту можна спостерігати навіть в світловий мікроскоп і потім оцінювати площу мембранного фрагмента в кінчику patch-піпетки.

Можна приблизно оцінювати площу втягнутих в кінчик patch-піпетки ділянок мембрани в двох експериментальних ситуаціях. У першому випадку мембранний фрагмент втягують в кінчик піпетки до тих пір, поки не утворюється гігаомний контакт. Ступінь деформації мембрани можна оцінити при збільшенні x500 або x1250, використовуючи або водно-іммерсійний об'єктив (x40) в звичайному мікроскопі, або об'єктив з масляною іммерсією (x100) в інвертованому мікроскопі. При отриманні бічної проекції піпетку розташовують так, щоб її вісь була майже паралельна (відхилення $<10^\circ$) фокальній площині. Мембранний фрагмент ізолюють механічно від іншої частини мембрани

відведенням кінчика піпетки на відстань 20-50 мкм від поверхні клітини і на цьому етапі фотографують кінчик піпетки. При створенні додаткового негативного тиску patch-піпетки фрагмент перестає контактувати зі скляною стінкою і приймає форму сферичної бульбашки (везикули), яка переміщується в кінчику вгору і вниз. Прикладаючи невелике позитивне тиск ($<5 \text{ см H}_2\text{O}$), бульбашку вводять в самий кінчик піпетки і фотографують. За допомогою таких мікрофотографій визначають площу мембранних фрагментів, втягнутих в кінчик піпетки при утворенні гігаомного контакту. Таким чином, при стандартному опорі patch-піпетки можна оцінити площу фрагмента в Ω -подібної конфігурації (тобто коли мембранний фрагмент знаходиться в контакті зі стінкою піпетки) і після утворення везикули.

Площа мембрани в Ω -подібної конфігурації можна оцінити, якщо уявити фрагмент у вигляді конуса, що має певну площу взаємодії зі склом, і півсферу, звернену до розчину в patch-піпетці. У везикулярній конфігурації площу фрагмента оцінюють за величиною його уявного діаметра.

У Ω -подібної конфігурації відношення площі півсфери до площі мембрани, яка контактує зі склом, становило 0,5-0,6. Значення загальної площі мембрани в двох конфігураціях - Ω -образної і везикулярної - майже однакові. Оскільки площу везикули можна оцінити точніше, вимірювання краще виконувати в цій конфігурації. Середня площа мембранних фрагментів, ізольованих піпетками з опором 2,5 МОм і досліджених в везикулярній конфігурації, складає в середньому 14 мкм^2 . Припускаючи, що ці фрагменти мають геометричну форму, зображену на рис. 1.4 (тобто відношення площі півсфери до площі мембрани, яка контактує зі склом частини, становить 0,5), отримаємо площу півсфери мембрани близько 5 мкм^2 .

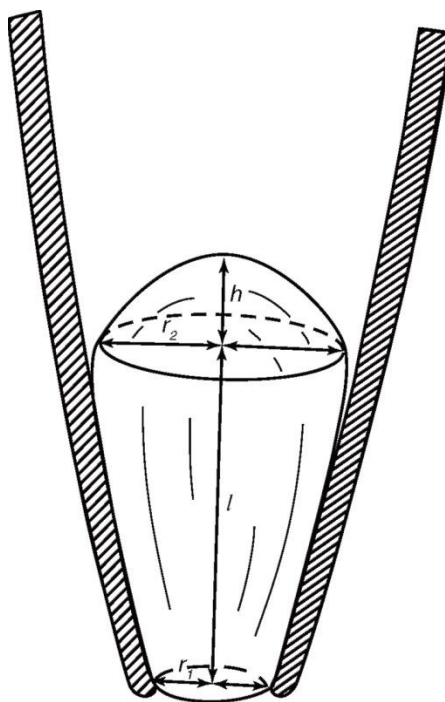


Рисунок 1.4 – Зображення контакту піпетки та мембрани

Варто також описати принципи реєстрації одиночних іонних каналів, яку здійснюють в режимі voltage-clamp. Уже створивши конфігурацію cell-attached або конфігурацію inside-out patch і outside-out patch, при досить високому значенні cell-attached і величиною посилення підсилювача можна зареєструвати поодинокі іонні канали, розташовані під піпеткою. Основний принцип реєстрації того чи іншого типу одиночного іонного каналу полягає в тому, що експериментатор повинен мати інформацію про величину підтримуваного потенціалу для цього типу каналу і про амплітуду тестованого потенціалу щодо підтримуваного потенціалу, при якій цей канал активується. Розглянемо ряд прикладів реєстрації деяких одиночних Ca^{2+} -каналів (рис. 1.5).

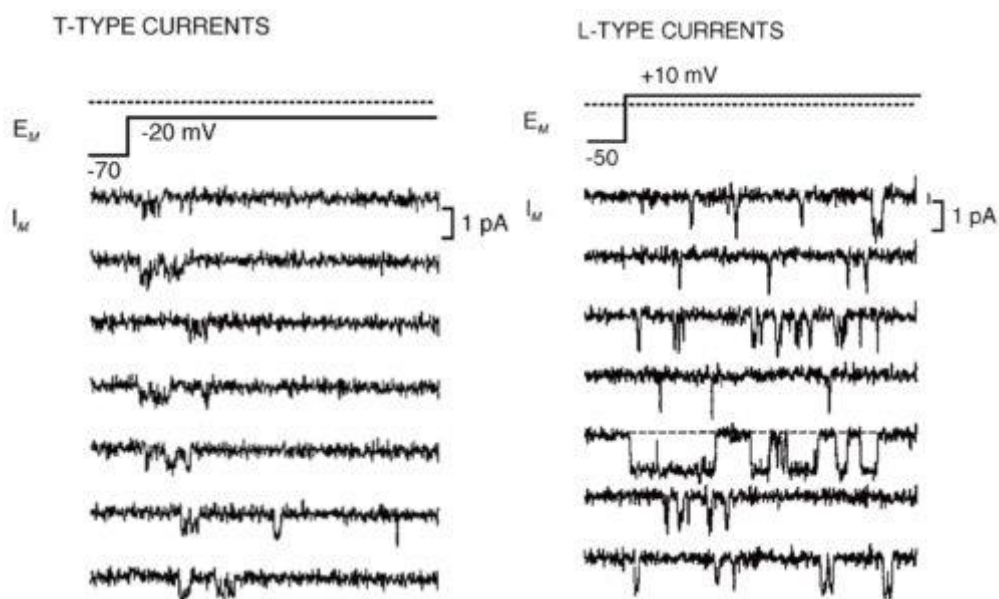


Рисунок 1.5 - Продемонстровані поодинокі Ca^{2+} -канали Т-типу, а також - поодинокі Ca^{2+} -канали L-типу. В обох випадках відкритий стан Ca^{2+} -каналів представлено у вигляді зсуву нульової лінії вниз, тобто через канал тече вхідний струм

Хоча струм, що йде через канали, реєструється і представлений в амперах (пА, нА), зазвичай після обробки обговорюють провідність одиночних каналів і використовують в якості одиниць виміру Сіменс (пС, нС). Це пов'язано з тим, що амплітуда струму визначається не як електрична, а як електрохімічна різниця потенціалів: $I [\text{pA}] = (U_m - U_{\text{rev}}) / R$. Оскільки після винаходу методу діалізу клітин з'явилася можливість міняти як потенціал, так і середовище всередині і зовні клітини, то вимірюваний струм відображається як зміна потенціалу на мембрані U_m , так і потенціалу реверсії U_{rev} . Застосовується зазвичай поняття «провідність». Це має сенс для каналів з лінійною вольтамперною характеристикою, оскільки дає параметр, що не залежить від умов експерименту. Для «складних» потенціалозалежних каналів (наприклад, кальцієвих) все одно пишуть додатково і потенціал, і склад розчину.

Таким чином, принципово реєстрація одиночних каналів не викликає будь-яких ускладнень (за умов наявності сучасної апаратури і добре приготованих клітин). Головне питання полягає в тому, за якими правилами і як обробити величезний обсяг інформації, що реєструється від каналу. Без хорошого програмного забезпечення вирішити цю проблему практично неможливо. Перш за все, експериментатор чекає наявності якісних зображень зареєстрованої каналної активності, що визначається хорошим технічним забезпеченням і хорошим персональним комп'ютером (гігагерцевого діапазону) з сучасною програмою обробки. Більш складне питання - принципи самої обробки даних та їх інтерпретація, для глибокого розуміння чого необхідно застосування теорії ймовірностей і статистичного аналізу.

1.2 Метод ПЛР

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, PCR) - метод молекулярної біології, що дозволяє створити копії певного фрагмента ДНК з вихідного зразка, підвищивши його зміст в пробі на кілька порядків.

Відкриттю полімеразної ланцюгової реакції передував розвиток молекулярнобіологічних технологій.

У 1869 р І. Мішером була відкрита ДНК. Біологічна функція нової речовини була не ясна.

У 1944 р вчені О. Евері, К. Маклеод і М. Маккарті провели ряд експериментів з трансформації бактерій і довели, що за трансформацію (придбання хвороботворних властивостей нешкідливою культурою в результаті додавання в неї мертвих хвороботворних бактерій) відповідають виділені з пневмококів ДНК.

Аж до 50-х років XX століття точна будова ДНК і спосіб передачі спадкової інформації залишалися невідомими, хоча і було доведено, що ДНК складається з кількох ланцюжків, що складаються з нуклеотидів. ДНК - полімерна молекула, що складається з послідовності блоків - нуклеотидів. Кожен нуклеотид складається з азотистої основи, цукру (дезоксирибози) і фосфатної групи. Зв'язки між нуклеотидами в ланцюжку утворюються за рахунок дезоксирибози і фосфатної групи (фосфодієфірні зв'язку). У переважній більшості випадків (крім деяких вірусів, що містять одноланцюгову ДНК) макромолекула ДНК складається з двох ланцюжків, орієнтованих азотистими основами один проти одного [5].

У 1955 р А. Корнберг відкрив фермент, який назвав ДНК-полімеразою. Цей фермент здатний подовжувати ланцюг ДНК, приєднуючи нуклеотиди до її 3'-кінця. У штучних умовах фермент каталізує реакцію добудовування ділянки шуканої ДНК від затравки (праймера), яка комплементарно пов'язана з ланцюгом ДНК (матрицею). Розчин, в якому відбувається ця реакція, повинен містити нуклеозидтрифосфат (дНТФ), які використовуються в якості будівельних блоків [6].

У 1971 р Х. Клеппе і співавтори розглянули дані, що стосуються складу інгредієнтів реакційної суміші, і принципи використання коротких штучно синтезованих молекул ДНК-праймерів для отримання нових копій ДНК. Однак можливість використання ПЛР в плані напрацювання великої кількості копій нуклеїнових кислот ще не розглядалася. Це було пов'язано з технічними труднощами, зумовленими необхідністю трудомісткого синтезу праймерів, і нестабільністю ферменту. На початку використання методу ПЛР після кожного циклу нагрівання та охолодження ДНК-полімерази доводилося додавати в реакційну суміш, так як вона швидко інактивувалася при високій температурі, необхідної

для поділу ланцюгів спіралі ДНК. Процедура була дуже неефективною, вимагала багато часу і ферментів [7].

У 1975 р Т. Брок і Х. Фриз відкрили *Thermus aquaticus* - паличкоподібну екстремально термофільну бактерію, а в 1976 р з неї була вперше виділена Таq-полімераза. Перевагою даного ферменту була здатність стабільно працювати при підвищених температурах (оптимум 72-80 ° С).

У 1983-1984 рр. К. Мюлліса провів ряд експериментів по розробці ПЛР і першим почав використовувати Таq-полімеразу замість певних видів термодруку ДНК-полімерази. Це дозволило прискорити роботи по розробці полімеразної ланцюгової реакції. Крім того, К. Мюлліс разом з Ф. Фалунь розробили алгоритм циклічних змін температури в ході ПЛР [8].

Таким чином, сформувався принцип використання ПЛР як методу ампліфікації *in vitro* заданих фрагментів ДНК з повністю або частково відомої послідовністю. Результатом відкриття ПЛР стало майже негайне практичне застосування методу. У 1985 р Саїк з співавторами опублікували статтю, в якій була описана ампліфікація геномної послідовності β-глобіну. З цього моменту кількість публікацій про застосування ПЛР в роботах стало збільшуватися в геометричній прогресії [9].

Особливо бурхливий розвиток метод ПЛР отримав завдяки міжнародній програмі «Геном людини». Були створені сучасні лазерні технології секвенування (розшифровки нуклеотидних послідовностей ДНК). Це в свою чергу сприяло значному зростанню інформаційних баз даних, що містять послідовності ДНК біологічних об'єктів.

В даний час запропоновані різні модифікації ПЛР, показана можливість створення тест-систем для виявлення мікроорганізмів, виявлення точкових мутацій, описані десятки різних застосувань методу.

Таким чином, відкриття методу ПЛР стало одним з найбільш видатних подій в галузі молекулярної біології за останні десятиліття. Це дозволило підняти медичну діагностику на якісно новий рівень [10].

Для проведення ПЛР необхідно наявність в реакційній суміші (РС) ряду основних компонентів.

Праймери - штучно синтезовані олігонуклеотиди, що мають, як правило, розмір від 15 до 30 нуклеотидів, ідентичні (комплементарні) протилежним кінцям протилежних ланцюгів шуканої ділянки ДНК-мішені. Служать запалом для синтезу комплементарної ланцюга за допомогою ДНК-полімерази і грають ключову роль в утворенні і накопиченні продуктів реакції ампліфікації.

Тaq-полімераза - термостабільний фермент, який забезпечує добудовування 3'-кінця другого ланцюга ДНК згідно з принципом комплементарності.

Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - дезоксіденозінтрифосфат (ДАТФ), дезоксигуанозінтрифосфат (ДГТФ), дезоксцитозінтрифосфат (дЦТФ) і дезокситімідінтрифосфат (дТТФ) - будівельний матеріал, який використовується Таq-полімеразою для синтезу другого ланцюга ДНК.

Буфер - суміш катіонів та аніонів в певній концентрації, що забезпечує оптимальні умови для реакції, а також стабільне значення рН.

Аналізований зразок - підготовлений до внесення в реакційну суміш препарат, який може містити шукану НК, наприклад ДНК мікроорганізмів, що служить мішенню для подальшого багаторазового копіювання. При відсутності НК-мішені специфічний продукт ампліфікації не утворюється.

Для зручності детекції та контролю ефективності ампліфікації до складу реакційної суміші можуть бути включені додаткові компоненти.

Позитивний контроль (ПКЗ - позитивний контрольний зразок) - являє собою штучно синтезовану олігонуклеотидну послідовність, строго відповідну шуканої. Відповідно, праймери для ПКЗ і шуканої мішені однакові, що дозволяє упевнитися в працездатності і збереження компонентів РС, необхідних для нормального проходження ПЛР.

Негативний контроль (негативний контрольний зразок - НКЗ) включає в себе всі компоненти реакції, але замість клінічного матеріалу або препарату НК вноситься відповідна кількість дейонізованої води або екстракту, що не містить досліджувану ДНК. Негативний контроль необхідний для перевірки компонентів реакції на відсутність в них ДНК або клітин збудника внаслідок контамінації і виключення обліку хибнопозитивних результатів.

Внутрішній контроль. Препарат НК може містити домішки інгібіторів, які помітно знижують ефективність ПЛР, а в деяких випадках можуть призводити до повної відсутності результатів дослідження. Крім того, можливі помилки на етапі складання ПК (наприклад, не додали будь-який компонент або саму НК), недотримання температурного режиму зберігання наборів реагентів або окремих їх частин (наприклад, розморожування і втрата активності ферментів) і ряд інших технічних моментів, які безпосередньо впливають на результати ПЛР. Тому стає необхідним контролювати хід ампліфікації в кожній пробірці з реакційною сумішшю. Для цього до складу реакційної суміші вводять додатковий внутрішній контроль (ВК). ВК - це штучно сконструйований препарат ДНК або РНК, який має принципово відмінну від шуканої олігонуклеотидних послідовність. Для ВК до складу РС вводять власні, строго комплементарні праймери. Концентрація ВК в РС повинна бути такою, щоб не складала конкуренції для ампліфікації навіть поодиноких шуканих молекул НК. Наявність амплікону ВК є свідченням нормального проходження реакції ампліфікації. Якщо амплікони шуканої НК відсутні,

але не утворився також і амплікон ВК, можна зробити висновок про технологічні порушення або про наявність в аналізованому зразку небажаних домішок. У будь-якому випадку результат реакції слід визнати недостовірним. ВК може бути використаний не тільки безпосередньо в складі РС для ампліфікації, а й для контролю якості виділення НК. Для цього його вводять в кожную пробірку з вихідним або попередньо обробленим зразком, проводять через етап виділення і тільки потім додають в ПК. Введення ВК з відомою концентрацією на етапі виділення особливо важливо для контролю кількісного ПЛР-аналізу. Якщо в аналізованому зразку присутня шукана ДНК, то в процесі реакції ампліфікації з нею відбуваються зміни, які забезпечуються певними температурними циклами. Кожен цикл ампліфікації складається з трьох етапів (рис. 1.6):

1. Денатурація - це перехід ДНК з дволанцюгової форми в одноланцюгову при розриві водневих зв'язків між комплементарними парами основ протилежних ланцюгів ДНК під впливом високих температур.

2. Відпал - це приєднання праймерів до одноланцюгової ДНК-мішені.

Праймери підбирають так, щоб вони обмежували шуканий фрагмент ДНК і були комплементарні протилежним ланцюгам ДНК. Відпал відбувається відповідно до правила комплементарності Чаргаффа. Якщо ця умова не дотримана, то відпалу праймерів не відбувається.

3. Елонгація (синтез). Після відпалу праймерів Таq-полімераза починає добудовування другого ланцюга ДНК з 3'-кінця праймера з використанням дНТФ.

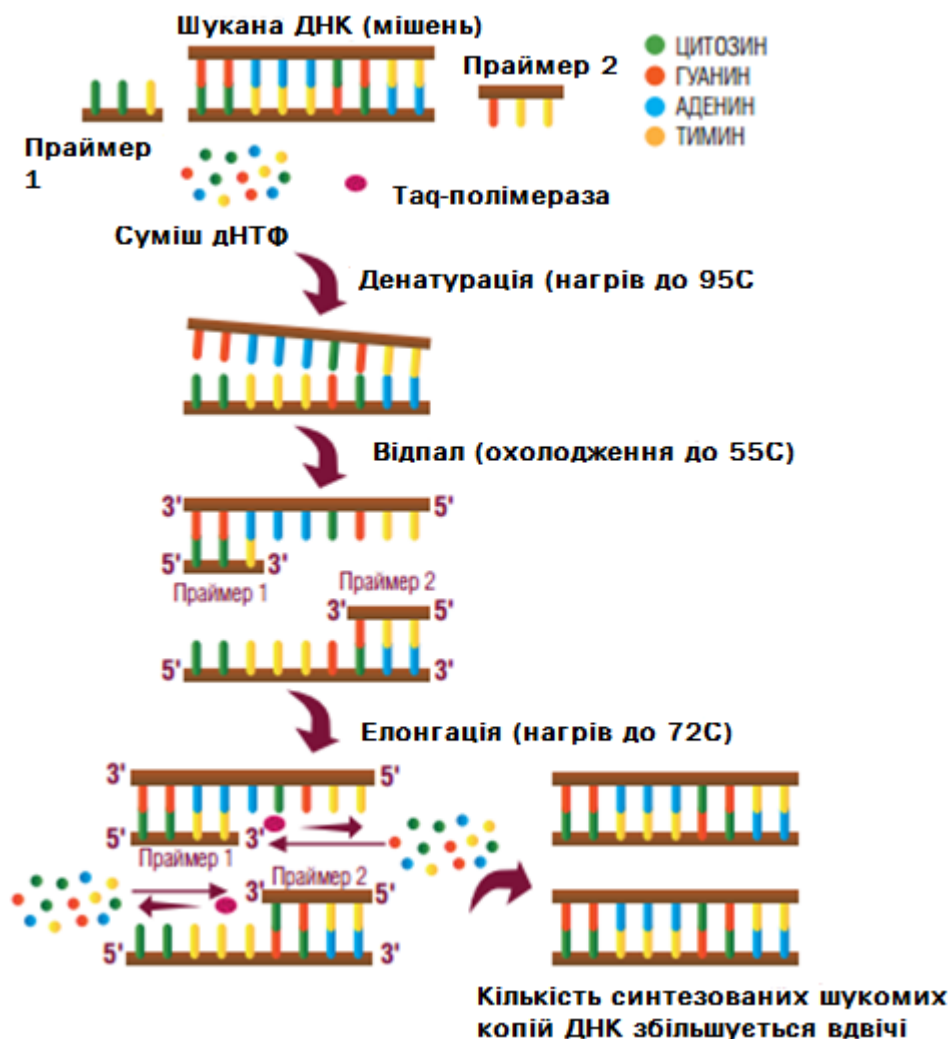


Рисунок 1.6 – Етапи ПЛР

Температурний цикл ампліфікації багаторазово повторюється (30 і більше разів). На кожному циклі кількість синтезованих копій фрагмента ДНК подвоюється.

Процес накопичення специфічних продуктів ампліфікації по геометричній прогресії йде лише обмежений час, а потім його ефективність критично падає - проявляється ефект плато. Термін «ефект плато» використовують для опису процесу накопичення продуктів ПЛР на останніх циклах ампліфікації, коли кількість амплікон досягає 0,3-1 пмоль.

На досягнення ефекту плато впливають:

- утилізація субстратів (дНТФ і праймерів);
- стабільність реагентів (дНТФ і ферменту);
- кількість інгібіторів, включаючи пірофосфати і ДНК-дуплекси;
- неспецифічні продукти і праймер-димери, конкуруючі за праймери, дНТФ і полімеразу;
- концентрація специфічного продукту за рахунок неповної денатурації при високій концентрації амплікону.

Для підготовки проби до постановки ПЛР використовують різні методики виділення в залежності від поставлених завдань. Їх суть полягає в екстракції (витягу) нуклеїнових кислот (ДНК або РНК) з досліджуваного матеріалу і видаленні або нейтралізації сторонніх домішок.

Для виділення нуклеїнових кислот в рутинній лабораторній практиці використовують три найбільш поширених підходи:

1. Експрес-методи (використовуються для виділення ДНК) базуються на температурному лізисі клітин і подальшому центрифугуванні, в результаті якого нерозчинні компоненти осідають на дні пробірки, а надосадова рідина (супернатант), що містить ДНК, використовується для проведення ПЛР. Метод простий у використанні, займає не більше 10-15 хвилин, забезпечує максимальний вихід ДНК, але малоефективний при роботі з матеріалом, що містить високу кількість домішок і інгібіторів ПЛР. Крім того, метод не може бути використаний для виділення РНК, так як РНКазі стійкі до нагрівання. При необхідності використання експрес-методів з «складними» зразками можливе введення додаткових способів очищення і концентрації матеріалу, наприклад в разі надлишку слизу в пробі (для мокротиння і еякуляту, бронхоальвеолярного лаважу, промивних вод бронхів, трахеального змиву, синовіальної і плевральної рідини) доцільними є попередня

відмивання і обробка муколітиком. Більш ефективним методом виділення і очищення нуклеїнових кислот (НК) при роботі з таким матеріалом може бути використання сорбентів або сильних хаотропних агентів [9].

2. Сорбентні методи виділення - диференціальна сорбція нуклеїнових кислот (допустимо виділення як ДНК, так і РНК) на твердому носії (найчастіше: силікагель з підвищеним від'ємним зарядом або модифікованою поверхнею, діатомова земля, тощо). Нуклеїнова кислота оборотно зв'язується зі склом в присутності високої концентрації хаотропних солей (наприклад, гуанідин). Інгібітори та інші компоненти клінічного матеріалу залишаються в розчині. Крім хаотропних солей в лізуючому буфері найчастіше присутні детергенти, які сприяють розчиненню і лізису білків. За допомогою центрифугування силіка з НК осідає, а супернатант з інгібіторами ПЛР видаляється. Серія наступних відмивань забезпечує отримання високоочищеного препарату НК. Актуальна на даний момент модифікація сорбентного методу - виділення на магнітних частинках в ручному або автоматичному режимах. Використання магнітних твердих носіїв має ряд переваг в порівнянні з немагнітними сепараційними методами. Для процесу виділення використовуються магнітні носії (синтетичні полімери, біополімери, пористе скло, оксид заліза з модифікованою поверхнею та інші) з високою афінністю до конкретної нуклеїнової кислоти. Зазвичай магніт прикладається до стінки пробірки, що містить зразок, щоб частинки агрегованих до стінки, а залишок зразка можна було прибрати. Таким способом можна відокремлювати компоненти клітинного лізата, які пригнічують ДНК-полімерази і ПЛР. При цьому можна виділяти як ДНК, так і РНК з високим виходом продукту із зразків, що містять значну кількість домішок. В цілому сорбентні методи забезпечують високу ступінь очищення нуклеїнових кислот, але можуть бути пов'язані з втратами (особливо в разі низького вмісту в зразку - «низькокопійний

зразок») внаслідок незворотньої сорбції на носії або в процесі декількох промивок. Крім того, залишкова кількість сорбенту в кінцевому розчині ДНК може пригнічувати ферментативні реакції ПЛР [9].

3. Спиртове осадження (преципітація) - агрегація НК (як ДНК, так і РНК) в присутності солі і спирту. Після осадження спиртом НК відділяється від розчину центрифугуванням. Осад, що містить цільову НК, неодноразово промивається спиртами і концентрується центрифугуванням. На завершальному етапі процедури відбувається розчинення НК в водному буфері, часто в процесі нагрівання до 55-65 ° С для кращого розчинення осаду. Перевагою даної технології є можливість роботи з «важкими» зразками, виділяти в рівній мірі як ДНК, так і РНК, однак спиртове осадження призводить до преципітації не тільки НК, а й білків, що в свою чергу ускладнює отримання чистого препарату. Найбільш простим шляхом вирішення проблеми з небажаними домішками є зменшення обсягу аналізованого зразка, однак такий підхід непридатний, якщо необхідно отримати результат з максимальним відгуком. Для забезпечення якості процесу виділення важливо враховувати не тільки «складність» матеріалу для дослідження і, виходячи з цього, підбирати найбільш ефективний метод екстракції, а й особливості цільової нуклеїнової кислоти [9].

ДНК є досить стабільним субстратом, повільніше руйнується під дією ДНКаз, краще зберігається при транспортуванні і зберіганні зразка і допускає застосування тривалих методик виділення з використанням великої партії зразків. Навпаки, РНК - нестабільний продукт, легко деградує в умовах тривалого транспортування і зберігання без додаткової стабілізації в спеціальних середовищах. В умовах неавтоматизованих методик екстракції виділення РНК краще проводити невеликими партіями, виходячи, наприклад, з ємності наявних в ПЛР-лабораторії

центрифуг, щоб уникнути деградації РНК в проміжках між етапами отмивок і центрифугування [10].

Таким чином, до вибору методу підготовки проби до ПЛР слід підходити з розумінням цілей проведення передбачуваних аналізів і особливостей матеріалу для дослідження.

На даний момент розроблені варіанти постановки ПЛР, спрямовані на вирішення наступних завдань: збільшення ефективності реакції і зниження ризику утворення неспецифічних продуктів; проведення якісного та кількісного аналізу шуканих ділянок молекули ДНК / РНК.

Найбільш поширеними модифікаціями ПЛР є [10]:

1. ПЛР з гарячим стартом (англ. Hot-start PCR) - модифікація методу, спрямована на запобігання неспецифічного взаємодії компонентів реакційної суміші до досягнення оптимальних умов ампліфікації. Залежно від складу і розміру праймери мають певну температуру плавлення (T_m - температура, при якій половина ДНК-матриць утворює комплекс з олігонуклеотидним праймером в присутності ферменту - полімерази). При дотриманні оптимальних умов (температура відпалу праймерів близька за значеннями до температури плавлення) праймер утворює стабільний комплементарний зв'язок з матрицею. Якщо ж температура реакційної суміші нижче T_m , то можливий неспецифічний відпал праймера на матрицю. Якщо в даний момент активний фермент в реакційній суміші відсутній, то елонгація неспецифічного комплексу не відбувається, що дозволяє уникнути хибнопозитивних результатів ПЛР [10].

Реалізація гарячого старту можлива двома основними способами:

- блокування полімерази антитілами або імітантами антитіл невеликими молекулами типу Affibody. Полімераза стає активною тільки при попередньому прогріванні реакційної

суміші при температурі 95 ° С протягом 10 хвилин - це умови, при яких руйнуються зв'язки «полімераза - антитіло» [11];

- використання легкоплавкого парафіну відокремлює полімеразу від компонентів реакційної суміші, запобігаючи їх передчасну взаємодію. Парафін плавиться при досягненні реакційною сумішшю температури вище 55 ° С, цього достатньо для початку специфічної взаємодії між компонентами реакційної суміші. При реалізації даного підходу важливим моментом є використання мінерального масла, яке при нагріванні забезпечує рівномірність плавлення парафіну і підтримання однорідності умов реакції (зниження ризику агрегації кристалів парафіну і конденсації компонентів реакційної суміші). Таким чином, ПЛР з «гарячим» стартом дозволяє мінімізувати ймовірність утворення неспецифічних продуктів ПЛР і можливість отримання хибнопозитивних результатів аналізу [11].

2. ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР, RT-PCR) використовується для ідентифікації відомої послідовності РНК. Суть реакції - синтез дволанцюгової ДНК на матриці одноланцюгової РНК. Для цього одноланцюгову молекулу РНК перетворюють в реакції зворотної транскрипції (ЗТ, англ. RT, reverse transcription) в комплементарну ДНК (кДНК) і далі ампліфікують вже ДНК-матрицю, використовуючи традиційну ПЛР. Використання ревертази пов'язано з деякими труднощами. Перш за все, даний фермент термолабільний і тому може бути використаний при температурі не вище 42 ° С. Так як при такій температурі молекули РНК легко утворюють вторинні структури, то ефективність реакції помітно знижується і за різними оцінками приблизно дорівнює 5%. Цей недолік може бути усунутий при використанні в якості зворотної транскриптази термостабільної

полімерази, яка проявляє активність в присутності іонів Mn^{2+} . Це єдиний відомий фермент, здатний виявляти як полімеразну, так і транскриптазну активність. ЗТ-ПЦР широко використовується для виявлення вірусів, геном яких представлений РНК (ВІЛ, гепатит С, віруси грипу та інші), для діагностики генетичних захворювань та напівкількісного визначення специфічних молекул РНК в клітині або тканини як індикатора експресії відповідних генів [11].

3. Мультиплексна (мультипраймерна) ПЛР - одночасна ампліфікація двох і більше шуканих послідовностей ДНК в одній пробірці. Кожна пара праймерів для мультиплексної ПЛР повинна володіти суворою специфічністю по відношенню до відповідної шуканої мішені, а умови повтору циклів повинні забезпечувати рівноефективний відпал всіх пар праймерів, що беруть участь в реакції, щоб вихід продуктів був по можливості однаковим. Перевагою даного методу є можливість проведення скринінгових досліджень з мінімальними витратами на додаткові матеріали. Крім того, з одного зразка можна отримати максимум інформації в рамках однієї постановки ПЛР. Проте мультиплексна ПЛР істотно обмежує можливості при ідентифікації низькокопійних зразків: якщо набір реагентів дозволяє виявити чотири шукані мішені + внутрішній контроль, і всі чотири мішені присутні в досліджуваному зразку, то в разі переважної кількості ДНК однієї або двох мішеней основний обсяг компонентів РС буде витрачатися саме на них (конкуренція за компоненти РС). У разі сумнівних результатів мультиплексної ПЛР рекомендується провести аналіз зразка з використанням наборів реагентів, призначених для виявлення однієї конкретної мішені. Важливо, щоб мультиплексні і моноплексні набори реагентів, які використовуються для перевірки сумнівних результатів, були одного виробника. Крім того, можливі й інші варіанти ПЛР, які

отримали найбільше поширення в науково-дослідних лабораторіях, наприклад [11]:

4. Гніздова (вкладена, англ. Nested PCR) ПЛР застосовується для зменшення числа побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК всередині продукту першої реакції [11].

5. ПЛР інвертована використовується в тому випадку, якщо відомо лише невелику ділянку всередині потрібної послідовності. Цей метод корисний, коли потрібно визначити сусідні послідовності після вставки ДНК в геном. Для цього проводять ряд розрізання ДНК рестриктазами з подальшим з'єднанням фрагментів [11].

6. Асиметрична ПЛР проводиться тоді, коли потрібно ампліфікувати переважно одну з ланцюгів вихідної ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридизаційного аналізу. Сама ПЛР проводиться як зазвичай, за винятком того, що один з праймерів береться у великому надлишку [11].

7. Метод молекулярних колоній. Дана модифікація заснована на використанні акріламідного гелю, який до початку ПЛР полімеризують з усіма її компонентами на поверхні. В процесі реакції в точках, що містять аналізовану ДНК, відбувається ампліфікація з утворенням молекулярних колоній [11].

8. ПЛР довгих фрагментів (англ. Long-range, PCR) - варіант ПЛР для ампліфікації протяжних ділянок ДНК (10 тисяч і більше основ). Для реалізації даного підходу використовують суміш двох полімераз: Таq-полімерази, яка характеризується високою процесивністю і здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК; Pfu-полімерази, яка володіє з 3'-5'-екзонуклеазною активністю і необхідна для видалення некомплементарних нуклеотидів [11].

9. Груп-специфічна ПЛР (англ. Group-specific PCR) - ПЛР з використанням праймерів до послідовностей ДНК для родинних груп всередині одного або між різними видами [11].

10. ПЛР з швидкою ампліфікацією решт кДНК (RACE-PCR) [11].

На сьогоднішній день існує кілька основних способів детекції результатів ПЛР [12]:

11. електрофоретичний (в агарозному або поліакриламідному гелі);

12. гібридизаційно-ферментний;

13. гібридизаційно-флуоресцентний:

- реєстрація продукту після закінчення реакції ампліфікації - «аналіз по кінцевій точці»;
- детекція продукту в режимі реального часу.

Найбільш поширеним донедавна був метод електрофорезу, заснований на поділі молекул ДНК за розміром (рис. 1.7). В цьому випадку візуалізацію результатів проводять в пластині агарозного гелю, який являє собою застиглу після розплавлення у електрофорезному буфері агарозу в концентрації 1,5-2,5% з додаванням спеціального барвника ДНК, наприклад бромистого етидія [12].

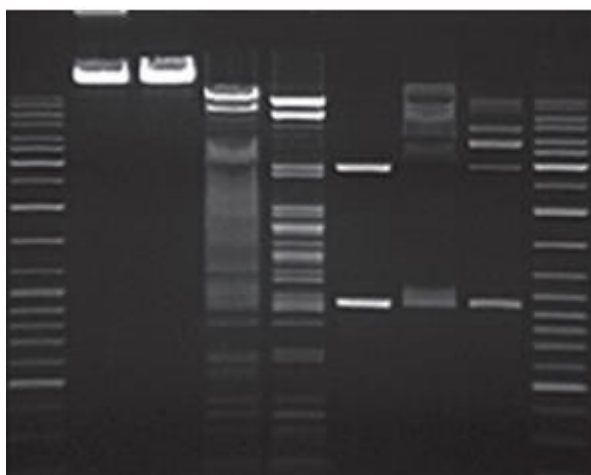


Рисунок 1.7 – Метод гелі-електрофорезу

Застигла агароза утворює просторову решітку. При заливанні за допомогою гребінок в гелі формуються лунки, в які вносять продукти ампліфікації. Пластину гелю поміщають в апарат для горизонтального гель-електрофорезу і підключають джерело постійної напруги. Негативно заряджена ДНК починає рухатися в гелі від мінуса до плюса. При цьому більш короткі молекули ДНК рухаються швидше, ніж довгі. На швидкість руху ДНК в гелі впливають: концентрація агарози, напруженість електричного поля, температура, склад електрофорезного буфера. Барвник вбудовується (інтеркалює) площинними групами в молекули ДНК. Всі молекули одного розміру рухаються з однаковою швидкістю. Після закінчення електрофорезу, що продовжується від 10 хвилин до 1 години, гель поміщають на фільтр трансільюмінатора, який випромінює світло в ультрафіолетовому діапазоні (254-310 нм). Енергія ультрафіолету, що поглинається ДНК в області 260 нм, передається на барвник, змушуючи його флуоресцентувати в оранжево-червоній області видимого спектру (590 нм). Яскравість смуг продуктів ампліфікації може бути різною, тому часто в ПЛР-лабораторіях прийнято оцінювати результат за трьох-, чотирьох- або п'ятибальною системою. Однак, як вже зазначалося раніше, це не можна пов'язувати з початковою кількістю ДНК-мішені в зразку. Часто зменшення яскравості світіння смуг пов'язано зі зниженням ефективності ампліфікації під впливом інгібіторів або інших факторів. Метод вертикального електрофорезу принципово схожий з горизонтальним електрофорезом. Їх відмінність полягає в тому, що в даному випадку замість агарози використовують поліакриламід і спеціальну камеру для вертикального електрофорезу. Електрофорез в поліакриламідному гелі має велику роздільну здатність в порівнянні з агарозним електрофорезом і дозволяє розрізняти молекули ДНК з точністю до одного нуклеотиду. Проте приготування поліакриламідного гелю трохи складніше агарозного, крім того, акриламід є токсичною

речовиною. Оскільки необхідність визначити розмір продукту ампліфікації з точністю до 1 нуклеотиду виникає рідко, то в рутинній роботі цей метод не використовують. Обидва варіанти електрофоретичної детекції дозволяють здійснювати тільки якісний аналіз і пов'язані з низкою проблем [13,14]:

1. Великі витрати часу на стадію детекції.
2. Неможливість автоматизації.
3. Складності і суб'єктивність трактування результатів.
4. Високий ризик контамінації та великі витрати на її усунення:
 - підвищені вимоги до організації лабораторії;
 - максимальне видалення зони детекції від інших зон проведення ПЛР;
 - виділення окремого співробітника на стадію детекції;
 - постійний контроль змивів;
 - велика кількість негативних контрольних зразків К для контролю контамінації амплікона, що призводить до збільшення обсягу витратних матеріалів і часу для підготовки до проведення детекції.

Флуоресцентні методи детекції побудовані на використанні флуорохромів - молекул, що володіють здатністю до світіння в результаті поглинання світлової енергії. Детекція здійснюється спеціальними приладами після ампліфікації (ПЛР з аналізом результатів по кінцевій точці) або в процесі ампліфікації (ПЛР в режимі реального часу). Технологія дозволяє мінімізувати ризик контамінації продуктами ПЛР і таким чином різко зменшити число хибнопозитивних результатів. Також менш строгі вимоги пред'являються до організації ПЛР-лабораторії, стають можливі автоматична реєстрація та інтерпретація отриманих результатів. Технології, які отримали комерційну реалізацію,

використовують інтеркалюючі барвники або флуорофор в складі олігонуклеотидних гібридизаційних зондів.

Контамінація (лат. Contaminatio; змішання) - потрапляння в певне середовище будь-якої домішки, що змінює досліджувані або використовувані властивості цього середовища. Стосовно до ПЛР контамінація може бути двох основних видів:

1. Контамінація амплікона. Виникає тоді, коли продукти ПЛР потрапляють в навколишнє середовище. Це може відбуватися з кількох причин: внаслідок неправильної організації ПЛР-лабораторії та порядку роботи в ній; через помилки при постановці полімеразної ланцюгової реакції або детекції результатів ПЛР (людський фактор); через великий потік досліджень. Контамінація може проявлятися в хибнопозитивних результатах ПЛР або виникненні неспецифічних продуктів ПЛР [15].

2. Перехресна контамінація від однієї проби до іншої може виникати при обробці зразків або в процесі приготування реакційної суміші. Слідство перехресної контамінації - спорадичні хибнопозитивні результати. При недотриманні заходів безпеки з плином часу в лабораторії можуть накопичуватися амплікони, що призводить до появи тотальної контамінації, коли амплікон «заражає» лабораторний посуд, автоматичні піпетки та лабораторне обладнання, поверхню лабораторних столів, одяг або навіть поверхню шкіри співробітників лабораторії (часто буває при автоклавуванні ампліфікаційних пробірок), що призводить до появи систематичних хибнопозитивних результатів [16].

Основні правила запобігання контамінації в лабораторії ПЛР:

- поділ функціональних робочих зон;
- дотримання поточності і напрямки руху аналізованих зразків;
- окремі лабораторні халати в кожній робочій зоні;
- одноразові рукавички без тальку;

- наконечники для дозаторів з фільтрами, що захищають від аерозолі;
- одноразові пластикові пробірки, посуд, наконечники;
- хімічна і УФ-дезінфекція всіх поверхонь робочих зон.

1.3 Метод кальцієвої візуалізації

Розробка та проектування органічних флуоресцентних індикаторів Ca^{2+} приблизно 30 років тому відкрили двері для візуалізації клітинних сигналів Ca^{2+} з високими рівнями деталізації. За цей час візуалізація Ca^{2+} революціонізувала підходи до аналізу функціональної організації на тканинному рівні і дозріла до потужного інструменту для візуалізації клітинної активності на місці у живій тварини *in situ*. Візуалізація Ca^{2+} *in vivo* з часовою роздільною здатністю в мілісекундах та просторовою роздільною здатністю в мікрометрах була досягнута завдяки новим конструкціям датчиків Ca^{2+} , розробці сучасних мікроскопів та потужних методів візуалізації, таких як двофотонна мікроскопія. Візуалізація сигналів Ca^{2+} в кластерах клітин у тканині в 3D дозволяє проводити аналіз інтегрованої клітинної функції, яка у випадку мозку дозволяє реєструвати закономірності активності в локальних ланцюгах [17].

Ca^{2+} - це найпоширеніший внутрішньоклітинний регулятор, який приймає участь у безлічі клітинних функцій, таких як секреція, скорочення, клітинна збудливість та експресія генів у всіх системах органів. Найбільш раннім визнав те, що іони кальцію необхідні для регулювання біологічних процесів, був Сідней Рінгер, який випадково виявив, що вапняна сіль необхідна для підтримки скорочень ізольованого серця жаби [18]. Інтегрована функція систем органів в цілому досягається узгодженою передачею сигналів цілими клітинними кластерами в органах

в синхронному або асинхронному режимах, а іони Ca^{2+} відіграють центральну роль у такій передачі сигналів. Отже, розуміння сигналів Ca^{2+} та їх часових та просторових характеристик у клітинах та тканинах має вирішальне значення як для отримання знань про фізіологічну регуляцію систем органів, так і для розробки фармакологічних підходів. Перший хімічний синтез органічних показників Ca^{2+} , заснований на хелатних властивостях Ca^{2+} EGTA, в 1970-х роках Роджером Ціеном та його колегами, зробив можливим безпосередній контроль клітинних сигналів Ca^{2+} [19]. Ранні дослідження були зосереджені на вимірюванні сигналів Ca^{2+} у гостро ізольованих живих клітинах та клітинах у культурі тканин. Однак необхідно було зрозуміти потік сигналу між клітинами в інтактних системах і охарактеризувати просторово дискретні та тимчасово складні сигнали, щоб описати фізіологічну регуляцію системи. Оскільки багато сценаріїв фізіологічного передавання сигналів неможливо точно відтворити *in vitro*, важливо реєструвати та аналізувати інтегровані сигнали між клітинами живої тканини *in vivo*. Досягнення оптичних та обчислювальних технологій дали потужні мікроскопічні системи, які дозволили реалізувати цю мету. Поєднуючи відповідні індикатори Ca^{2+} з відповідними методами оптичного зображення, клітинні сигнали Ca^{2+} , а іноді і потоки, контролюються з високим ступенем просторової та часової роздільної здатності. Такі підходи до зображення були розроблені для ряду тканин і систем органів на різних моделях тварин, і в останнє десятиліття ці зусилля призвели до захоплюючих уявлень про сигналізацію в цілих системах і були широко розглянуті [20].

Візуалізація сигналів Ca^{2+} у клітинах культури та зрізах тканин стала звичною справою у більшості лабораторій за останні два десятиліття. У цей час були розроблені методи дослідження клітинної фізіології та фармакології сигналів Ca^{2+} у багатьох різних клітинних та

тканинних системах на різних моделях тварин [21]. Більшість початкових досліджень були обмежені візуалізацією клітин у культурі. Однак дуже рано було визнано, що клітинні сигнали Ca^{2+} мають складні просторово-часові форми і поширюються як хвилі всередині клітин та між клітинами. З цієї причини гостро ізольовані тканини та органи завантажували індикаторними барвниками Ca^{2+} і візуалізували [22]. Альтернативним препаратом для дослідження тканин мозку є використання органотипових культур препаратів зрізів мозку [23]. Ці культури були марковані та зображені для вивчення фізіологічних режимів передачі сигналів. До цього часу визнання того, що сигнали Ca^{2+} організовані в спеціалізованих сигнальних мікродоменах у клітинах та координуються в певних часових послідовностях, призвело до експериментів із використанням більш цілих систем.

В ідеалі необхідно зобразити системи органів у живої тварини, щоб зрозуміти схеми передачі сигналів усередині тканини. В експериментах з клітинами печінки в культурі та перфузованою інтактною печінкою було встановлено, що викликані агоністами сигнали Ca^{2+} якісно та кількісно відрізняються в інтактному препараті порівняно із сигналами в ізольованих гепатоцитах [24]. Мозок унікальний за своєю сигнальною організацією, де відчуття та поведінка кодуються у шаблонах діяльності в нейрональних мережах. Через послідовність мереж інформація про активність передається іншим асоціативним регіонам мозку, де досягається інтеграція сигналів та моделі діяльності. Цей ланцюг подій, можливо, відбувається в серії важливих етапів обробки в локальних мікросхемах. Активність у місцевих ланцюгах не точно фіксується в ізольованих зрізах мозку або культуральних препаратах. Необхідно зобразити цілі мозкові ланцюги живої тварини, щоб зрозуміти клітинну сигналізацію у фізіології та обробці інформації. Крім того, ряд досліджень показав, що дендритна збудливість модулюється різними

факторами, включаючи іонний склад, збудливі та гальмівні входи, а також активацію та інактивацію залежних від напруги провідностей. З цієї причини дендритні сигнали, зафіксовані в препаратах зрізів мозку, відрізняються від записів *in situ* у інтактних тварин [25]. Ці спостереження дали поштовх для розробки методів дискретної доставки показників Ca^{2+} до клітин *in situ*, використовуючи ін'єкцію клітин або масове завантаження для візуалізації у інтактної живої тварини.

Всюдисуща природа Ca^{2+} як внутрішньоклітинного месенджера спонукала вчених шукати індикатори Ca^{2+} , які дозволять оптично вимірювати концентрацію Ca^{2+} у цитоплазмі клітин. Найбільш ранні вимірювання внутрішньоклітинної динаміки Ca^{2+} відбулися після вилучення та опису чутливого до Ca^{2+} біоломінесцентного білка аекворину з медуз *Aequoria victoria* [26]. Аекворин, витягнутий з тканини медуз, інжектували в клітини для моніторингу швидких змін внутрішньоклітинного Ca^{2+} шляхом вимірювання змін люмінесценції [27]. Приблизно в цей час металохроматичні барвники, такі як мурексид та арзеназо III, також використовувались для вимірювання внутрішньоклітинної концентрації іонізованого Ca^{2+} [28]. Хоча спочатку ці барвники були багатообіцяючими, залежні від Ca^{2+} спектральні зміни були дуже чутливими до коливань pH, які, як відомо, відбувалися в клітинах [29]. Аекворин, з іншого боку, був недоступний і вимагав мікроін'єкції в окремі клітини, і з цієї причини його використання залишалося у власності небагатьох фізіологів. Крім того, аекворин інактивується під час випромінювання світла, а отже, його використання обмежувалось короткотривалими експериментами. З відкриттями та розробкою органічних флуоресцентних індикаторів Ca^{2+} для флуориметричної мікроскопії розпочався новий напрямок досліджень клітинної сигналізації Ca^{2+} . В даний час для рутинного використання

доступна велика кількість органічних флуоресцентних зондів та індикаторів на основі флуоресцентних білків.

Наприкінці 1970-х Роджер Цієн та його колеги синтезували перший органічний флуоресцентний індикатор Ca^{2+} , quin-2, який продемонстрував значне збільшення випромінювання флуоресценції при зв'язуванні Ca^{2+} . Дельта зв'язування Ca^{2+} становила приблизно 100 нМ, що робило quin-2 придатним як цитоплазматичний індикатор Ca^{2+} . Хоча його широко застосовували для вимірювання концентрації цитоплазматичного Ca^{2+} у живих клітинах, quin-2 мав ряд недоліків [30]. Цієн та його колеги вдосконалили цю початкову конструкцію та синтезували серію подібних сполук, які змінювали свої флуоресцентні властивості при зв'язуванні Ca^{2+} з різною спорідненістю [31]. Цей розвиток спричинив вибух досліджень щодо клітинної сигналізації Ca^{2+} і призвів до розвитку сімейства стабільних, яскраво флуоресцентних індикаторів Ca^{2+} з різною спорідненістю до Ca^{2+} у фізіологічних концентраціях [32]. Ca^{2+} чутливі барвники можна класифікувати на дві категорії: одиничні індикатори довжини хвилі та раціометричні індикатори. Перші демонструють значну залежність від Ca^{2+} зміни інтенсивності флуоресценції без зміщення довжин хвиль їх збудження або випромінювання. Раціометричні індикатори, навпаки, зміщують свою пікову довжину хвилі або збудження, або випромінювання при зв'язуванні Ca^{2+} . З цієї причини цей клас барвників забезпечує дуже точну кількісну оцінку концентрації Ca^{2+} , яку можна скоригувати на нерівномірне завантаження барвника, фотовідбілювання барвників, що витікає, та зміну об'єму клітин. Fura-2, Fluo-3, Fluo-4, кальцій-green-1 та Oregon green BAPTA - все це сімейство органічних індикаторів Ca^{2+} . Були розроблені методи наповнення клітин цими органічними молекулами у досить високих концентраціях, придатних для флуоресцентної мікроскопії [33]. Ряд лабораторій розробив технології для

дослідження всіх аспектів клітинної біології сигналізації Ca^{2+} в різних системах клітин та органів.

Стала доступною велика кількість флуоресцентних органічних показників Ca^{2+} з різною спорідненістю до Ca^{2+} та константами швидкості зв'язування [34]. Високоафінні барвники з константами дисоціації в субмікромолярних концентраціях (0,1–0,3 мкМ) були корисними для вимірювання концентрацій Ca^{2+} у цитоплазмі [35]. Показники низької спорідненості з константами дисоціації в сотнях мікромолярних Ca^{2+} були корисними для вимірювання Ca^{2+} у клітинних компартментах, де концентрації Ca^{2+} коливалися в діапазоні низьких мілімолярних [36]. Оскільки цитоплазматичні сигнали Ca^{2+} , як правило, мають перехідний характер, вони вимірюються в нерівноважних умовах. З цієї причини необхідно знати про швидкість, з якою індикатор пов'язується з Ca^{2+} . Найчастіше використовувані органічні флуоресцентні індикатори Ca^{2+} мають константи рівноважної швидкості зв'язування від 5 до 20 мкс. На сьогоднішній день існує більше 25 різних органічних флуоресцентних барвників, які комерційно доступні з різних джерел. Ці барвники широко варіюються за константами спорідненості до Ca^{2+} і часу зв'язування [37].

Відкриття флуоресцентних білків, що трапляються в природі, призвело до широкого використання зеленого флуоресцентного білка (GFP) у біологічних дослідженнях клітин [38]. FPI - це чутливі до Ca^{2+} флуоресцентні або люмінесцентні білки та їх химерні конструкції, які можуть експресуватися в конкретних підмножинах клітин досліджуваної тканини за допомогою клітинних і тканиноспецифічних промоторів [39]. Ці білки були генетично націлені та експресувались у специфічних клітинах та клітинних відділах неінвазивно за допомогою молекулярної біології та трансгенних методів. Мутантні форми цих флуоресцентних білків були розроблені з дуже різними спектральними властивостями

випромінювання [40], і це відкрило можливість для розвитку флуоресцентних білків з індукованим Ca^{2+} резонансним переносом енергії Фостера (FRET) [41]. Химерні конструкції флуоресцентних білків та Ca^{2+} -зв'язуючих білків, таких як кальмодулін та тропонін-С, були розроблені з отриманням орієнтованих на клітини показників Ca^{2+} . Деякі з цих індикаторів флуоресцентного білка Ca^{2+} нового покоління (FPI) були розроблені з двома різними мутантами GFP (наприклад, блакитний флуоресцентний білок (CFP) та жовтий флуоресцентний білок (YFP)) на основі змін ефективності FRET при зв'язуванні Ca^{2+} . FPI є потужним інструментом для візуалізації Ca^{2+} *in vivo*, оскільки вони підтримують виявлення сигналів у клітинах та клітинних відділах від дискретних типів клітин в інтактній тканині. Це було відкриттям для різних сфер біології, особливо в нервовій системі, де за допомогою цієї техніки можна спостерігати за активністю локальної мережі у тварин за допомогою відповідних методів.

Протягом 1990-х років стали доступними два класи індикаторів, що генетично кодуються, на основі флуоресцентних білків, наприклад, камелеони [42] та ті, що базуються на люмінесцентних білках, аекворині та обеліні [43]. Найпершими із генетично кодованих індикаторів Ca^{2+} були різні підкласи циклічно перетворюваних GFP, де мутація різних амінокислот поблизу хромофорної частини GFP давала показники, які оборотно змінювали інтенсивність флуоресценції при зміні концентрації Ca^{2+} в середовищі. Це були периками, які збільшували інтенсивність флуоресценції із збільшенням концентрації Ca^{2+} , і зворотні периками, які зменшували інтенсивність флуоресценції із збільшенням концентрації Ca^{2+} та раціометричних перикам [44]. Перикам успішно використовується у багатьох фізіологічних програмах візуалізації від скорочення м'язів *Caenorhabditis elegans* до нейронів миші [45]. Другим класом флуоресцентних протеїнів Ca^{2+} були інгредієнти, і вони були

розроблені з кальцій-зв'язуючим білком кальмодуліном, вставленим між положеннями 144 і 146 YFP. Залежна від Ca^{2+} конформаційна зміна в кальмодуліновій частині індукує іонізацію хромофору, що призводить до 7-8-кратного збільшення флуоресценції YFP [46]. Камгару, як і перикам, виявилися корисними для фізіологічного запису *in vivo* у дрізофіли та мишей, де була зафіксована активність у нейронах нюхової цибулини [47]. Третьою ітерацією GFP, що перетворюється по колу, був G-CaMP, і ця нова конструкція призвела до значного збільшення флуоресценції GFP при зв'язуванні Ca^{2+} [48]. G-CaMP викликав набагато більші зміни флуоресценції у відповідь на збільшення концентрації Ca^{2+} порівняно з конструкціями на основі FRET, і був швидко прийнятим для моніторингу сигналів Ca^{2+} *in vivo* у ряду видів [49]. Хоча повільна кінетика G-CaMP обмежувала тимчасову роздільну здатність сигналів, надзвичайна яскравість і, отже, підвищений сигнал були привабливими. Ряд удосконалень було зроблено за допомогою стратегій точкових мутацій, що призвели до G-CaMP2 та, нещодавно, G-CaMP3 з поліпшеною кінетикою [50]. G-CaMP3 є останньою розробкою і має принаймні втричі підвищену яскравість та динамічний діапазон, що робить її потенційно дуже цінним інструментом для візуалізації *in vivo*. G-CaMP3 використовували для високошвидкісного зображення мережевої активності в руховій корі та виявляли перехідні амплітуди Ca^{2+} , лінійно залежні від числа потенційного дії.

Кальмодулін або тропонін-С служили чутливими до Ca^{2+} доменами в конструкції, яка зазнала конформаційних змін, що призвело до підвищення ефективності FRET. Було синтезовано ряд різних показників цього класу, включаючи YC 2.1, YC 3.1, YC 3.60 та тропонін. Багато з цих камелеонів на основі FRET успішно використовуються для реєстрації сигналів Ca^{2+} на різних моделях тварин *in vivo*.

Останньою розробкою в класі генетично кодуючих FPI є проектування химерної конструкції аекворину, люмінесцентного датчика Ca^{2+} та GFP. Аекворин - це біолюмінесцентний фотопротейн, який випромінює світло при зв'язуванні з Ca^{2+} . Ця властивість аекворину успішно застосовується для візуалізації Ca^{2+} *in vivo*. Низький квантовий вихід люмінесценції ускладнює виявлення подій Ca^{2+} з коротким часом інтеграції (<1 с) або з роздільною здатністю однієї клітини. Для подолання цієї проблеми нещодавно була розроблена химерна конструкція, що імітує власну структуру білка у медуз, де люмінесценція чутливого до Ca^{2+} аекворину призводить до біолюмінесцентного резонансного переносу енергії (BRET) в GFP, випромінюючи світло у видимому діапазоні (509 нм). Використовуючи цей принцип, були розроблені химери аекворину-GFP, які показали швидко реагуючі індикатори Ca^{2+} , які виробляють яскраве випромінювання світла у видимому діапазоні та у великому динамічному діапазоні концентрацій Ca^{2+} (0,1 мкМ – 1,0 мМ), і нечутливі до рН у фізіологічному діапазоні. Порівняно з одним екзорином, випромінювання химерної конструкції з оптимізованою гнучкою лінкерною областю більш ніж у 60 разів вище. Цей датчик Ca^{2+} отримав назву GA (GFP-аекворин) і є потужним інструментом для функціонального картографування нейрональних ланцюгів *in vivo*. GA пропонує дуже високу контрастність, високу емісію сигналу завдяки тому, що світло випромінюється за відсутності освітлення, а отже, автофлюоресценція відсутня. Ця відсутність автофлюоресценції є перевагою при зображенні невеликих структур глибоко всередині тканини. Ще однією головною перевагою перед флуоресценцією є відсутність фототоксичності та відбілювання флуорофору. Незважаючи на те, що це суттєві переваги, основним недоліком зображення люмінесценції GA є погана просторова роздільна здатність у порівнянні з візуалізацією на основі флуоресценції. Однак

тимчасова роздільна здатність найчастіше є адекватною навіть при накопиченні фотонів шляхом інтеграції з часом. Нещодавній огляд порівнює переваги та недоліки флуоресцентної візуалізації порівняно з біоломінесцентною візуалізацією за допомогою GA.

Попередня інформація ілюструє активну дослідницьку діяльність у розробці інструментів для зображення Ca^{2+} *in vivo* з хорошим часовим та просторовим дозволом. Хоча було винайдено ряд індикаторів Ca^{2+} , які сприяли розумінню клітинної сигналізації в контексті інтактних тварин, жоден з них не виявився універсальним, ідеальним показником. Слід приділити пильну увагу вибору зонда та техніки візуалізації, яка відповідатиме експериментальним вимогам, з метою покращення якості даних та зменшення токсичності.

Новою технологією маркування тканин та клітин індикаторами є розробка генетично кодуючих, флуоресцентних індикаторів на основі білків. Перевагою генетично кодованих індикаторів Ca^{2+} у порівнянні з синтетичними барвниками є можливість націлювання показника конкретно на клітини, що нас цікавлять, з використанням плазмідних конструкцій, що націлюються на послідовності. Крім того, це дозволило здійснювати тривалу візуалізацію сигналів Ca^{2+} дискретно, не тільки в окремих популяціях клітин, але і в конкретних субклітинних компартментах інтактних живих тварин. Крім того, це дозволяє проводити повторне зображення тієї самої тканини у однієї тварини. І методи трансфекції, і трансгенні технології були легко доступні для довгострокового стабільного вираження показників у вибраній тканині.

Найчастіше застосовуваний метод націлювання FPI на клітини тварин - використання трансгенних методологій. Плазмідні розроблені з кодуючими послідовностями FPI з відповідними промоторами для конкретного націлювання на клітини, що представляють інтерес для модельного організму. Потім плазмідні доставляють до клітин-реципієнтів

за допомогою пронуклеарних ін'єкцій, гомологічної рекомбінації або ретровірусного перенесення в ембріони на ранніх стадіях. Трансгенне націлювання флуоресцентних білків на конкретні типи клітин було досягнуто для кожного органу у дрібних безхребетних, таких як дрозофіла, та великих ссавців, включаючи приматів. Дуже важливо вибрати конкретні промотори, щоб уникнути приєднання до інших типів клітин, ніж передбачувана мішень. Крім того, рівень експресії флуоресцентного білка залежить від того, наскільки сильною є експресія промотору. Повсюдна експресія FPI у всіх клітинах також проводилася з використанням промоторів, що містяться в більшості типів клітин в організмі, таких як β -актин. Специфічна експресія камелеонів у нейронах була досягнута у трансгенних мишей з використанням промоторів білка *thy1*.

ДНК-конструкції, що містять відповідні промотори, сконструйовані з кодуючими послідовностями FPI, також можуть бути упаковані в плазміді і трансфіковані в клітини за допомогою методів проникнення, таких як опосередкований ліпосомами перенос або електропорація. Внутрішньоутробно використовували електропорацію для доставки плазмідних конструкцій, які направляють експресію флуоресцентних білків в ембріональний мозок. Флуоресцентні білки та FPI спрямовувались на конкретні клітини та клітинні групи як у мозку, так і в інших тканинах за допомогою вірусних векторів. В одному з експериментів УС 3.60 камелеон був упакований у вектор AAV (аденоасоційований вірус), щоб направити експресію FPI в нейронах, що призвело до стійкої експресії в різних ділянках мозку у мишей. Візуалізація нервової активності *in vivo* була успішно проведена у мишей, що вільно пересуваються, з використанням однофотонної оптичної системи на основі оптичного волокна. В іншому дослідженні вектор вірусу псевдогерпесу простого вірусу був використаний для упаковки

іншого індикатора, тропонеона, і доставлявся до клітин серцевого м'яза у собаки.

Найперші записи сигналів Ca^{2+} *in vivo* були зроблені в препаратах, які були легко доступні для візуалізації. Ці ранні експерименти на інтактних тваринах використовували органічні синтетичні барвники Ca^{2+} та епіфлуоресцентну мікроскопію з використанням камер. У поєднанні з ін'єкцією індикаторних барвників та епіфлуоресценцією або конфокальною мікроскопією досліджували різні поверхневі структури, особливо сенсорні системи. Вибір цих структур на моделях безхребетних або дрібних хребетних тварин був головним чином обумовлений надзвичайно обмеженою глибиною, яку можна було отримати за допомогою звичайних методів візуалізації. Розсіяння світла запобігає фіксації змін флуоресценції в клітинах за допомогою епіфлуоресценції та конфокальної мікроскопії більше ніж на 20 мкм під поверхнею.

Поява багатофотонної лазерної скануючої мікроскопії додала потужний інструмент для зображення клітинних та субклітинних структур навіть у сильно розсіюючих тканинах. Концепцію двофотонної конфокальної мікроскопії продемонстрували Denk et al., коли вони показали, що флуорофори в живій тканині можуть збуджуватися потоком інфрачервоних лазерних імпульсів. Цей принцип був реалізований у конфокальній мікроскопії і був швидко прийнятий біологами для візуалізації ізольованих тканин та інтактних тварин. Однією з важливих переваг двофотонної лазерної скануючої мікроскопії є те, що вона дозволяє візуалізувати клітини глибиною всередині тканини на кілька сотень мікрон, забезпечуючи функціональну візуалізацію з високою роздільною здатністю у живих тварин, включаючи ссавців. Інноваційні технології сканування були розроблені для надшвидкого зображення з великою кількістю клітин у тривимірному просторі з роздільною здатністю у часі.

Візуалізація Ca^{2+} за допомогою двофотонної конфокальної мікроскопії майже завжди реалізується на фіксованій вертикальній платформі мікроскопа, що вимагає знеболення та знерухомлення тварини з зображенням області, що піддається об'єктиву. Хоча руху через дихання та пульсу не можна уникнути, фіксація тварини мінімізує артефакти руху. За останнє десятиліття було проведено велику кількість функціональних досліджень зображень Ca^{2+} з використанням цього підходу в ряді систем органів та тваринних моделей. Більша частина цієї роботи була зосереджена на зображувальній діяльності в мозку, і було здійснено низку досягнень. Візуалізація популяцій нейронів дозволяє одночасно реєструвати спонтанні та викликані відповіді у великій кількості клітин, так що можна зробити висновок про функціонування цілих ланцюгів. Шляхом фарбування великих популяцій клітин з використанням стратегій ін'єкції проникної для клітин форми органічних барвників, ін'єкції декстранового кон'югованого барвника в пучки аксонів або використання вірусної інфекції з використанням FPI, упакований у вірусні вектори, може зобразити великі популяції нейронів, використовуючи ці методи для одночасного запису спонтанної активності, а також викликаних відповідей.

Однією з основних проблем болюсного навантаження великих популяцій клітин є те, що всі різні типи клітин, такі як нейрони та гліальні клітини, маркуються. Для вирішення цієї проблеми хоча б частково доступні різні стратегії. Сульфародамін-101 успішно використовувався для ідентифікації астроцитів під час експериментів із зображеннями. Іншим методом є мічення шляхом мікроін'єкції пучків аксонів кон'югованими індикаторами декстрану та використанням аксонального транспорту протягом декількох годин, щоб ретроградно та антероградно мітити нейрони перед візуалізацією. Такий підхід ретроградного маркування нюхової системи у дрозоділи показав, що

специфічні рецептори показали різні спектри лігандів та значно вищу чутливість *in vivo* порівняно з аналогічними експериментами *in vitro*. Проблема специфічного маркування також ефективно вирішується використанням генетично кодуючих FPI для цільових клітин за допомогою клітин-специфічних промоторів. Цей підхід був успішно використаний для вивчення паралельної активації волоконного шляху в мозочку у мишей, що експресують G-CaMP2 у нейронах *in vivo*. Цим авторам вдалося виміряти перехідні процеси Ca^{2+} у пучках паралельних волокон через неушкоджений череп. В іншому дослідженні камелеон YC 3.1 експресувався в польових м'язах дрогофіли для реєстрації перехідних процесів Ca^{2+} в міоплазмі, одночасно реєструючи потужність м'яза. Подібним чином G-CaMP2 експресувався в серцевих м'язах у трансгенних мишей, щоб реєструвати перехідні процеси Ca^{2+} , пов'язані з серцебиттям, у серцях, що розвиваються в ембріонах. Автори змогли описати організацію атріовентрикулярної провідності та розвиток атріовентрикулярного вузла. У мозку неінвазивна природа досліджень зображень Ca^{2+} *in vivo* змінює фокус дослідження на запис із кластерів центральної нервової системи, відкриваючи двері для системної нейронауки. Крім того, технічні нововведення дали методи рутинної транскраніальної візуалізації [50], включаючи повторне зображення тих самих нейронних ланцюгів у даної окремої тварини протягом тижня та місяця. Коркові ланцюги були зображені у фіксованому положенні голови через прозоре черепне вікно, імплантація відбувалася під наркозом. Ці методи виявились справжнім відкриттям для нових досліджень в галузі нейронаук протягом останнього десятиліття, що дозволило дослідити зв'язок у нервових мікросхемах мозку.

Зовсім недавно почалися зусилля з розробки методів зображення тканини клітинного рівня у активних тварин. В одному з методів транскраніальне зображення клітинних сигналів Ca^{2+} проводили на

знеболеній, фіксованій голові миші для вивчення сигналізації в кортикальних шарах [51]. Сигнали Ca^{2+} реєструвались у пірамідальних нейронах і 2-х кортикальних нейронах та астроцитах, завантажених барвником у відповідь на сенсорні подразники. Технологічні інновації вкрай необхідні для поліпшення зображень у неанестезованих тварин. Для реалізації цієї мети потрібно подолати кілька технічних перешкод. По-перше, мікроскопи повинні бути досить малими, щоб їх несла тварина, яка є вільно рухлива. По-друге, пристрій повинен зберігати функціональність звичайного мікроскопа. По-третє, прилад повинен бути достатньо міцним, щоб мінімізувати добровільні та мимовільні артефакти руху тканин. Реалізація всіх трьох цілей була складною, але робота над ними зробила вирішальний крок вперед із винаходом мініатюрного двофотонного мікроендоскопа на основі волоконно-оптичного апарату, який можна було б встановити на щурі або миші. Цей пристрій включав волоконну оптику для введення як променя збудження, так і для збору випромінюваного світла від коркових пірамідальних нейронів у активних тварин [52]. Хоча ця форма візуалізації страждає від обмеженого поля зору та низької просторової роздільної здатності, вона пропонує чудову часову роздільну здатність, і вона може працювати із великими клітинними кластерами [52]. У мозку мікроендоскопічна двофотонна мікроскопія забезпечує контроль синхронної активності у цілих нейронних ланцюгах і може бути використана для вивчення будь-якої області мозку [53]. Мікроендоскопи використовують новий підхід, що передбачає використання мікроелектромеханічних сканерів у поєднанні з лінзами з градієнтним індексом (GRIN) на оптичних волокнах [53]. Ці інженерні розробки зробили можливим мініатюризацію скануючого пристрою, одночасно забезпечуючи волоконно-оптичний трос. Оскільки лінза GRIN заломлює світло за допомогою градієнта показника заломлення, її оптичні поверхні є плоскими і дозволяють ефективно

фокусувати та збирати світло, зберігаючи загальний форм-фактор невеликим. Хоча значна робота зосереджена на реєстрації сигналів Ca^{2+} у нейронних ланцюгах головного мозку, мікроендоскопія в невральній тканині залишається сферою діагностичної ендоскопії та є рутинною в діагностиці патологій шлунково-кишкового тракту та дихальних шляхів. На сьогоднішній день системи мікроендоскопії на основі волоконно-оптичних оптичних систем не досягли такої якості оптичного зображення, як встановлені на сцені, нерухомі мікроскопи для запису клітинних сигналів Ca^{2+} в тканині. Технічні інновації для вдосконалення волоконно-оптичної, мікроендоскопічної, двофотонної мікроскопії необхідні, оскільки візуалізація пробуджених тварин, що вільно поводяться, зрештою необхідна для вирішення багатьох фізіологічних питань у дослідженнях *in vivo*.

Нещодавно вчені розробили методи для підготовки мишей до співпраці в експериментах із візуалізацією за допомогою двофотонної мікроскопії. Дослідники провели транскраніальну візуалізацію у фіксованих мишей, і їм вдалося записати сигнали Ca^{2+} з нейронних ланцюгів в корі стовбура, пов'язаних із сенсорно-моторною активністю. В одному дослідженні було продемонстровано функціональні властивості нейронів кори ствола, що проєктуються на первинну рухову кору. Автори виявили, що нейрони, що проєктуються на первинну моторну кору, мають великі рецептивні поля, що свідчить про те, що змішані нейрони в первинних сенсорних областях посиляють специфічні стимульні особливості в різних відділах мозку. В іншій серії експериментів мишей навчали реагувати певною поведінкою, тобто їсти винагороду у відповідь на певні запахи і не виробляти поведінку на інший запах. Під час такої поведінки через черепне вікно були зображені коркові нейрони, і авторам вдалося ідентифікувати дві ділянки моторної кори язика, що не перекриваються. Багато нейронів у цих регіонах демонстрували

модуляцію, що збігається або передує дії харчування, відповідно до їх участі в руховому контролі. Крім того, вони виявили, що нейрони, що знаходяться поблизу, виявляють глибоку співпадаючу активність і що ця тимчасова кореляція активності зростає в міру просування навчальних завдань, що свідчить про структурну пластичність, пов'язану з навчанням [53].

Паралельно з цим група дослідників просунула нововведення у використанні химерних конструкцій аекворину-GFP (GA) щодо візуалізації Ca^{2+} *in vivo* у активних тваринах [54]. Люмінесцентний біосенсор генетично кодується в тканині, що представляє інтерес, і тварин зображують за допомогою високочутливих електронно-множувальних камер [54]. Прокинувшись, тварини зображуються протягом тривалого періоду часу, хоча і з відносно поганою просторовою роздільною здатністю. Хоча цей метод забезпечує розумну часову роздільну здатність, клітинна роздільна здатність у просторі рідко можлива, що є головним недоліком. Однак сигнал є чудовим завдяки повній відсутності автофлюоресценції, оскільки оптичне збудження не потрібно. Індукована Ca^{2+} аекворинова люмінесценція посилюється за рахунок резонансного перенесення енергії на GFP [55]. Цей підхід повинен буде зачекати на винахід надчутливих пристроїв захоплення зображень, щоб реалізувати просторову та часову роздільну здатність, необхідну, щоб зробити його корисним інструментом для отримання зображень Ca^{2+} *in vivo*.

Висновок до розділу 1

Була проаналізована література з теми магістерської дисертації. Наведена гіпотеза про те, що основним рецептором сприйняття механічних подразнень в м'язевому шарі сечового міхура є канал Piezo1.

Наведене також описання електрофізіологічного методу петч-клемп, який і буде провідним методом для дослідження механочутливості в цій роботі.

Описаний метод візуалізації кальцієвої сигналізації, що, в залежності від цілей та об'єктів експерименту показує вивільнення з клітин йонів Ca^{2+} , що відіграють важливу роль у життєдіяльності клітин та функціонуванні окремих механізмів в цілому, при застосуванні зовнішнього подразника на клітину. Метод дозволяє як кількісно, так і якісно оцінити клітинну кальцієву сигналізацію та зробити висновки щодо досліджуваних зразків, виходячи з умов експерименту.

Крім цього, описаний метод полімеразної ланцюгової реакції, що є методикою визначення наявності певних фрагментів нуклеїнових кислот, що відповідальні за кодування досліджуваних білків. Цей метод є актуальних у даній роботі, адже має показати фундаментальну функціональну присутність мРНК Piezo-1 у міоцитах детрузора.

РОЗДІЛ 2

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1.1 Об'єкт, матеріали та методи дослідження

В якості модельного об'єкта дослідження вибрали щура лабораторного лінії Вістар. Вік щурів, що залучалися до експериментів, становив 3 місяці. Всі тварини були статевозрілі; маса обраних тварин – до 250г.

Для проведення експерименту необхідно було всипити тварину та виділити необхідний орган, у випадку нашої роботи – детрузор (сечовий міхур). Щура всипляли у металевому герметичному боксі, підвищуючи концентрацію парів ефіру. Далі тварину фіксували на лабораторній гільйотині та проводили декапітацію. Після декапітації щур закріплювався на лабораторному планшеті для препаратів, відбувався розтин. Знаходився потрібний орган (детрузор), вирізався. Наступним кроком була підготовка органу для експериментів. Для електрофізіологічного та кальциметричного досліджень задачею було отримати суспензію з клітинами. Отже, для цих етапів сечовий міхур розтягувався на планшеті для мікроманіпуляцій, та під мікроскопом очищався від уротелію (жирового шару) та скупчень кровоносних судин. Залишковий м'язовий шар нарізався маленькими лабораторними ножицями на смужки розміру близько 1мм, аби усі частинки сечового міхура рівномірно оброблялися ферментним розчином.

Далі були приготовані розчини для зберігання тканин та клітин, що імітують «комфортні» для життєдіяльності клітин умови – це без кальцієвий розчин та розчин із низьким складом Ca^{2+} , аби плавно доводити концентрацію йона до фізіологічного рівня. Також для

проведення експериментів методом patch-clamp був виготовлений так званий розчин Тіроде, а також розчин, що відповідає за складом елементів та хімічним показникам складу цитоплазми клітини.

Аби отримати суспензію із клітинами, необхідно зруйнувати усі пептидні зв'язки між амінокислотами у білках тканини. Для цього були приготовлені інші розчини, до складу яких входили протеїнази – ферменти, що руйнують пептидні сполуки, дозволяючи отримати у подальшому відокремлені, але при цьому цілі і живі клітини. Для цього тканину у два етапи поміщували у термостат із температурою 37°C у цих розчинах послідовно на фіксований час. Якщо всі умови були виконані коректно, отримувалася суспензія з клітинами, які поміщали потім у окремі чашки Петрі в розчин, фізіологічно «комфортний» для них. Далі, в залежності від обраного експерименту, клітини переносилися або на patch-clamp установку, або готувалися до кальциметрії.

Для підготовки матеріалу до дослідження методом ПЛР шматки сечового міхура переносилися у так зване транспортне середовище (що містить поверхнево активні речовини та за своїм складом дозволяє довго зберігати зразки із біоматеріалом, аби зберегти його для подальших експериментів). Тканина у пробірці із транспортним середовищем роздрібнювалася спеціальним товкачиком до речовини, близької до однорідної. Отриману суспензію далі підготовлювали до ПЛР.

Усі експерименти над тваринами відбувалися із дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які задіяні у експериментальних цілях (Страсбург, 16 березня 1986 року).

1.2 Дослідження методом Петч-Клемп

Отже, для проведення електрофізіологічних досліджень потрібна суспензія із виділеними клітинами (в даному випадку – міоцити сечового міхура). Отриману суспензію гладеньких міоцитів фіксували на малих пластикових чашках Петрі. Для цього на поверхню чашки наливали 2 мл розчину Тіроде, після чого рівномірно розподіляли 100-200 μ л суспензії клітин. Чашки нерухомо витримували 15 хв. та починали експеримент. Шукали потрібну клітину, що мала морфологічну відповідність до гладенько-м'язових клітин, чіткі краї та прозору цитоплазму, що свідчить про нормальний стан клітини. Далі запускали програмне забезпечення Clampex 8.0 (США) для обробки та запису електричних явищ на мембрані клітини. Вмикали електропідсилювач фірми PC – One Dagan instrument (США) для посилення реєстрованого струму та компенсації зовнішніх артефактів. В чашку Петрі з розчином занурювали референтний електрод. В електрофізіологічну мікропіпетку з боросилікатного скла заливали «зовнішній» розчин та вставляли хлор срібний (AgCl_2) електрод. Після занурення у розчин проводили компенсацію дифузійного потенціалу. За допомогою мікроманіпулятора (модель MP-225, SUTTER Instrument Co, США) підводили мікропіпетку до клітини. Доторкнувшись до мембрани клітини, бачили зростання опору в піпетці та починали піднімати тиск в системі до отримання гігаомного ($\text{G}\Omega$) контакту. Для цього вмикали компенсацію "паразитної" ємності, що виникає через діелектричні властивості боросилікатного скла, та починали поступово підіймати тиск в мікропіпетці для розриву біліпідної мембрани в зоні отвору піпетки. Надірвавши мембрану, здійснювали компенсацію послідовного опору (R_s) та переходили до власне реєстрації трансмембранних струмів. Для цього було використано декілька електрофізіологічних протоколів. Для

початку, перевіряли життєздатність клітин за допомогою Ramp-протоколу (1 стимуляція на 200 мс) схема якого зображена на рис. 2.1. Наступним кроком була механічна стимуляція мембрани клітини.

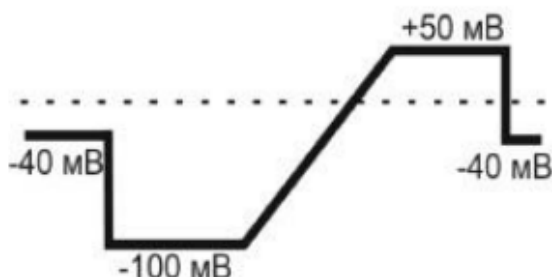


Рисунок 2.1 - Електрофізіологічний протокол: фаза відпочинку -40 мВ, крок «вниз» з стимуляцією у -100мВ, поступове збільшення напруги, стимул +50 мВ

Для того, аби побачити присутність струму крізь йонний канал у відповідь на механічний стимул було обрано спосіб стимуляції зміною тиску рідини на клітину (англ. shear stress). Спочатку була використана аплікаційна система, котру використовували для внесення фармацевтичних засобів в роботах з іншими каналами. Система мала значний об'єм розчину та отвір 1 мм. Однак даний спосіб виявився непридатним для активації механочутливих каналів. З цією метою було використано систему аплікації нанолітрових порцій розчинів за допомогою адаптованого для цієї мети мікроінжектора (Drummond Nanoject I фірми LASER, США), котрий можна використовувати з мікропіпеткою з отвором, меншим за розмір клітини. Даний мікроінжектор призначався для введення розчинів з мРНК в ооцити жаби *Xenopus* з метою гетерологічної експресії там йонних каналів. Спочатку на пулері фірми SUTTER Instrument Co. (США) виготовляли скляні, тонкостінні мікропіпетки з розміром отвору на кінці в 3-5μм. Потім наповнювали їх зовнішнім розчином Тіроде та на голку мікроінжектора.

Після цього мікроманіпулятором наводили кінчик піпетки в поле зору мікроскопа над клітиною, котра була попередньо під'єднана до електрофізіологічної піпетки. Мікропорціями (50 μ л) випускали розчин на клітину та фіксували електрофізіологічну зміну поведінки клітини.

Згідно до нашої гіпотези, механочутливість в сечовому міхурі, окрім уротеліальних клітин та периферичних терміналей нейронів ДКГ, забезпечують також і гладенькі міоцити. Для того, аби зафіксувати механочутливість в гладеньких міоцитах детрузора (ГМД), було сконструйовано власну систему керованої аплікації зовнішньо-клітинного розчину (рис. 2.2). Існує кілька методичних підходів для активації механо-індукованого струму в клітинах: натисканням мікроскопічною або піпеткою з запаяним отвором, гідродинамічної стимуляції розчином безпосередньо на клітину, створення потоку рідини над клітиною, створення тиску електрофізіологічною піпеткою (для петч-клемп конфігурації "cell-attached"), викривлення мембрани шляхом вбудовування в неї ліпідів, що формують вигини або розтягування за допомогою магнітних часток, що специфічно приєднуються до каналу. Спершу нами був протестований метод гідродинамічної стимуляції розчином, направленим на конкретну клітину. Для системи керованої аплікації струменем розчину було пристосовано інжектор Nanoinject I, що був сконструйований для введення нанолітрових об'ємів рідини в ооцити *Xenopus laevis* (рис. 2.2). Він може поступово виштовхувати розчин з тонкостінної скляної мікропіпетки голкоподібним металевим поршнем (рис. 2.2). Наступна задача полягала в конструюванні системи, яка б дозволила підводити насаджену на поршень мікропіпетку в поле зору мікроскопу та точно виставляти її кінцевий отвір над клітинами, які досліджувалися. Для цього систему керованої аплікації монтували на механічний мікроманіпулятор (рис. 2.2). Крім того, систему було

заземлено, аби позбутись електричних артефактів від решти обладнання при реєстрації трансмембранних струмів на клітинах (рис. 2.2).



Рис. 2.2 - Система для механічної стимуляції ізолюваних клітин. Загальний вигляд апарата для створення локального гідродинамічного тиску: 1 — голкоподібний поршень, 2 — рукав заземлення, 3 — механічний мікроманіпулятор, 4 — мікроінжектор Nanoinject I

Ізолювані ферментативним шляхом клітини детрузора саджали на пластикові чашки Петрі діаметром 35 мм, вкриті полі-L-лізином для адгезії клітин на поверхню підложки. Для фіксації потенціалу дії в результаті механо-індукованої активації використали рамповий протокол, який починався з фази "відпочинку" впродовж 200 мс, далі подавався стимул -40 мВ, після чого відбувався поступовий підйом до $+50$ мВ (рампова фаза).

Протокол починався з фази «відпочинку» у -40 мВ, далі подавався стимул із кроком «вниз» і стимуляцією у -100 мВ, після чого відбувався поступовий підйом до стимулу $+50$ мВ. У результаті, на ізолюваних клітинах було проведено 5 експериментів зі стимуляцією механо-

індукованого струму гідродинамічним тиском. Прослідкувавши за відповіддю гладенького міоциту, спостерігали наявність різниці в струмах між записами під час механічної активації та контрольними записами. Перші 50 мс на контрольному записі у фазі «відпочинку» (потенціал спокою) бачили струм на рівні -20 пкА, який забезпечується роботою двопородоменних калієвих йонних каналів K2P. Далі бачили стрибок вниз через негативну стимуляцію зі струмом у -180 пкА та поступовий ріст напруги, бачили активність Ca^{2+} -каналів родини BC (англ. Big conductance), що створюють зашумлення відповіді за максимального значення напруги в протоколі +50мВ із струмом у +510 пкА.

На записі із механічною активацією бачили наступне: у фазі відпочинку значення струму стало -35 пкА; із негативним стимулом протоколу виміряне значення струму становило -210 пкА; із поступовим збільшенням напруги по протоколу значення струму стало +595 пкА. Графічне відображення отриманих результатів наведено на рисунку 2.3.

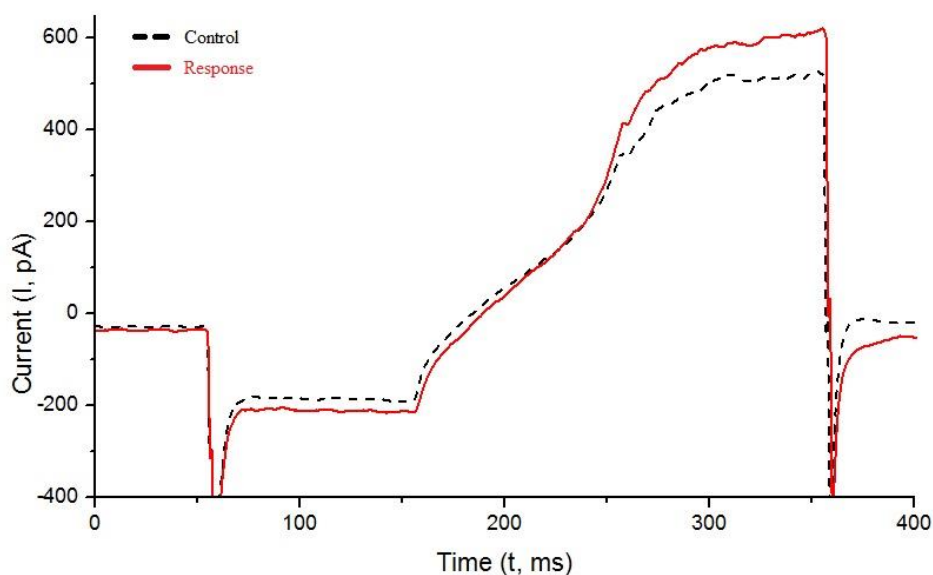


Рисунок 2.3 - Порівняльне зображення реєстрації контрольного та експериментального сигналів

Також за отриманими даними була побудована вольт-амперна характеристика запису відповіді клітини на механічну стимуляцію, що зображена на рисунку 2.4.

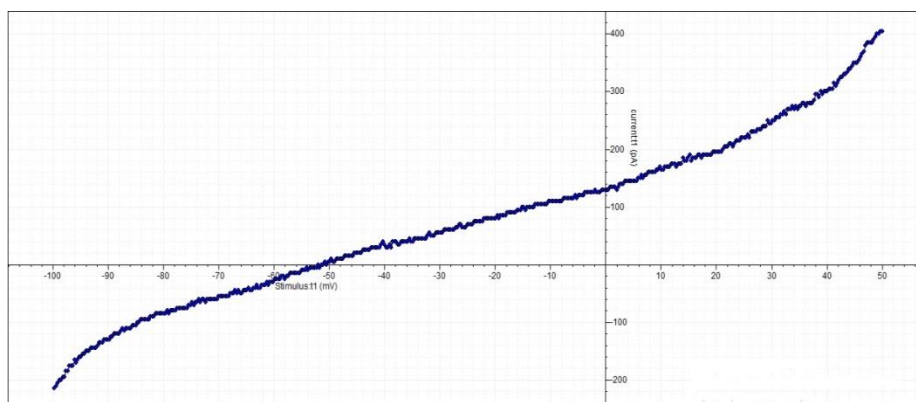


Рисунок 2.4 - Вольт-амперна характеристика відповіді клітини на механічну стимуляцію

Так, після перших вдалих позитивних відповідей, були проведені повторні експерименти із різними контрольними групами клітин, серед них були як успішні, так і невдалі відповіді (рис. 2.5)

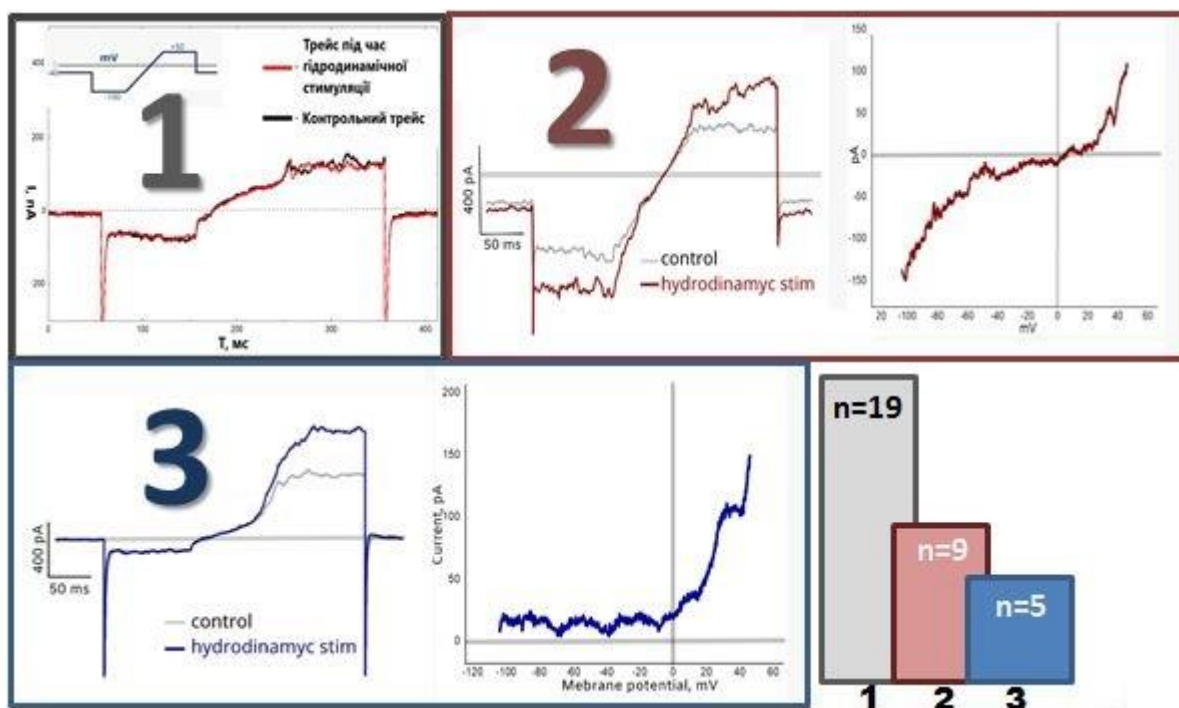


Рисунок 2.5 – Повторення експерименту із гідродинамічним тиском на різних групах міоцитів.

Отримані позитивні результати дозволили перейти до наступного кроку із візуалізацією кальцієвого сигналу на відповідь у прикладання зовнішнього подразника.

1.3 Візуалізація кальцієвої сигналізації

Для підтвердження наявності рецепторних властивостей механічних подразнень для цілої тканини сечового міхура було вирізано тонкі смужки (шириною ~ 2 мм) зі стінки органу. Після зафарбування Ca^{2+} -чутливим барвником Fluo 3AM та подальшого відмивання тканину переносили в розчин Тіроде. Для подальшого дослідження відповіді тканини на розтягнення, смужка була під'єднана за двома кінцями до ниток, якими тканину контролювано розтягували. Встановивши чашку Петрі діаметром 35 мм на предметний стіл мікроскопа, та стимулювали флюоресценцію об'єкта лазером. Розтягнення робили в 2 етапи: з 27 секунди до 180 — перший етап, з 180 по 287 секунду посилення розтягнення, далі смужку відпускали. У відповідь на розтягнення було зареєстровано значне підвищення інтенсивності флюоресценції барвника, що вказує на появу кальцієвого сигналу в клітині (рис. 2.6). Згідно з графіком, де по осі X показано зміна відносної різниці інтенсивності флюоресценції, а по осі Y — час відповіді, бачимо, що інтенсивність флюоресценції зросла більш ніж в 2 рази. Зважаючи на отримані результати, можна говорити про здатність сечового міхура до рецепції розтягнення. Зважаючи на наявність кальцієвої відповіді під час розтягнення в процесі рецепції, вірогідно, задіяні канали, що пропускають йони Ca^{2+} .

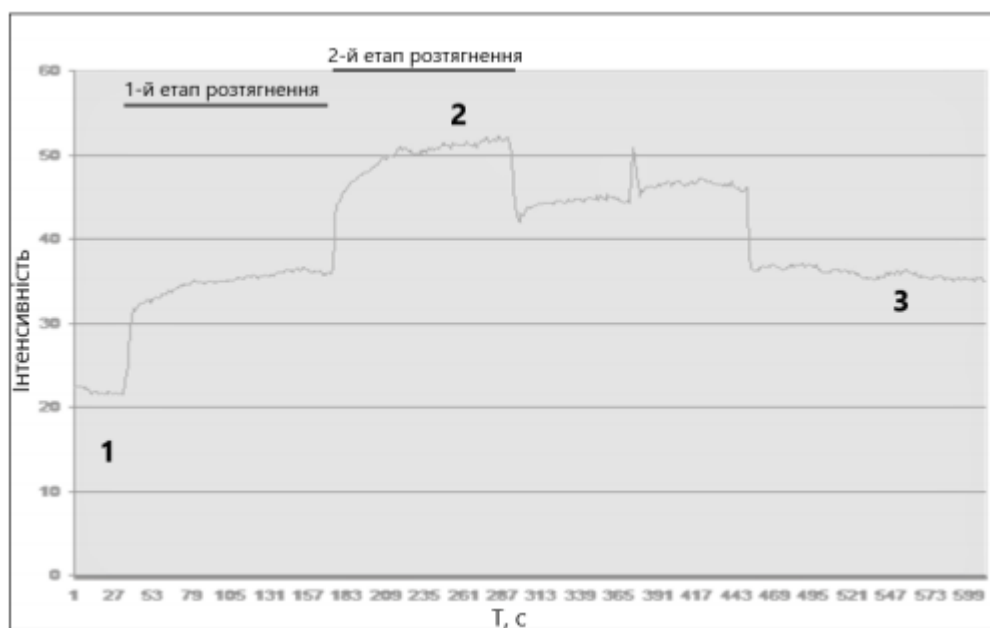


Рис. 2.6 - Графік механо-індукованої кальцієвої візуалізації відповіді цілої смужки сечового міхура у відповідь на розтягнення: 1 — смужка до стимуляції, 2 — кальцієва відповідь, 3 — завершення відповіді після розтягнення. Перший етап — розтягнення на 1мм, другий — на 2 мм.

Оскільки в стінках сечового міхура присутні різні типи тканини, в яких попередньо було показано присутність механочутливих йонних каналів, для підтвердження механочутливості саме гладеньких міоцитів детрузора необхідно стимулювати ізольовані клітини. Ізольовані ферментативним шляхом ГМД були поміщені в розчин Тіроде, де були завантажені Ca^{2+} -чутливим барвником, як було описано вище про смужку тканини. Аби дослідити кальцієвий сигнал, викликаний механічним подразненням по типу натискання на мембрану, було застосовано скляну мікропіпетку з запаяним кінчиком в якості зонду, котра була закріплена на мікроманіпуляторі, за допомогою якого тиснули на мембрану ізольованої клітини з кроком в 1 нм. Даний спосіб стимуляції механочутливості є одним з найбільш ефективних та використаних в літературі в багатьох роботах по до дослідженню

механочутливості. В наслідок натискання інтенсивність флюоресценції зростала, що вказує на збільшення концентрації цитозольного Ca^{2+} в гладенькому міоциті (рис. 2.7).

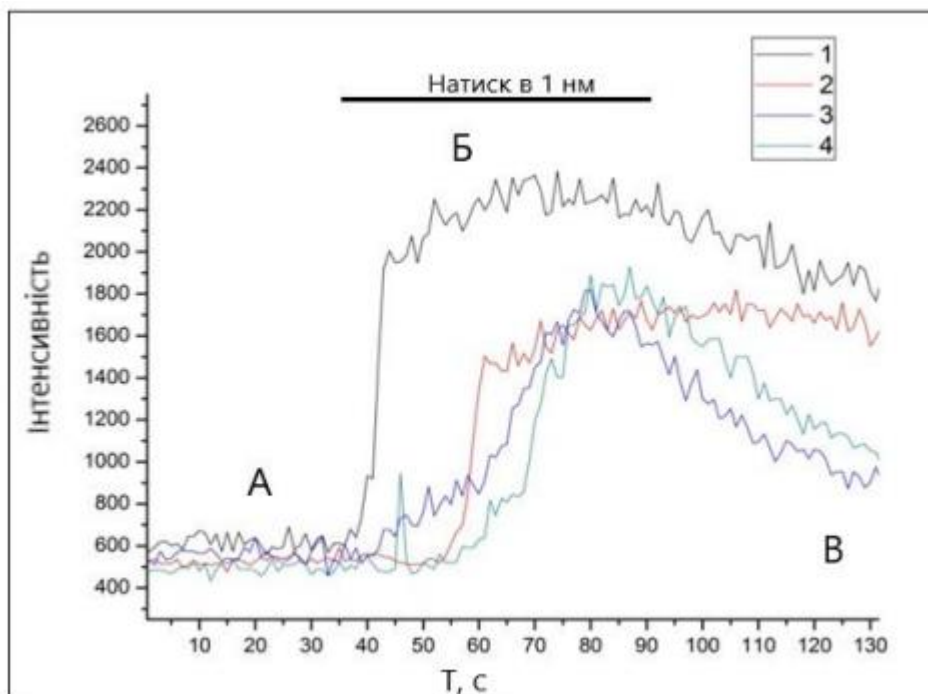


Рис. 2.7 - Механо-індукована кальцієва відповідь клітини м'язового шару сечового міхура. А — клітина до стимуляції, Б — механо-індукована відповідь, В — відновлення концентрації кальцію. Цифрами 1, 2, 3 та 4 позначено зміни флюоресценції в різних зонах інтересу (ROI) на одній клітині.

Як показано на графіку, кальцієвий сигнал розповсюджувався по всій клітині, однак в зоні натиску піпетки сигнал був більш яскравим, аніж в інших ділянках клітини. Клітина вийшла на плато сигналу за 5 секунд після стимуляції, після припинення якого сигнал поступово почав повертатись в попередній стан. Таким чином було зафіксовано механо-індукований сигнал в клітинах детрузора. На основі цих даних можна казати про наявність в гладеньких міоцитах функціонального механочутливого каналу, що забезпечує рецепцію до натиску, яким може бути Piezo1.

На мікрофотографіях клітин під час реєстрації кальцієвих інфлюксів (рис. 2.8) бачимо, що сигнал розповсюджується нерівномірно по всьому об'єму клітини і має експансивний характер. Подібний перебіг відповіді клітини вказує на здатність присутніх механочутливих каналів до системної сигналізації і індукування каскаду реакцій для загально-клітинної відповіді.

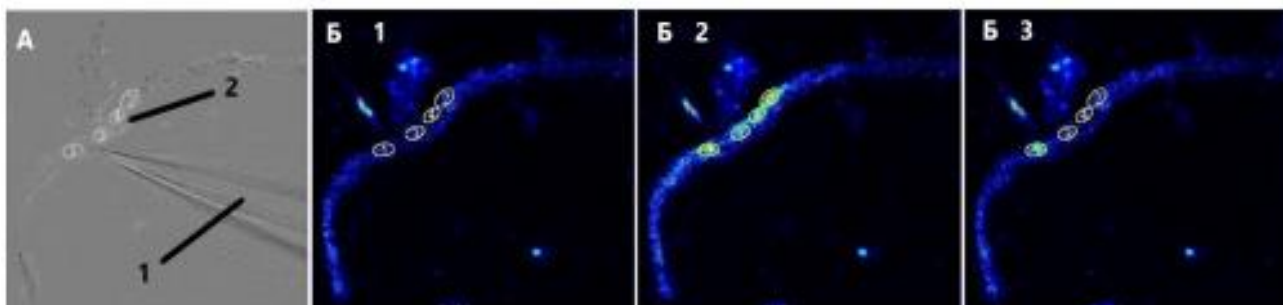


Рис. 2.8 - Візуалізація кальцієвого сигналу в ізольованому міоциті детрузора. А — гладенький міоцит із зондом для механічної стимуляції в прохідному світлі: 1 — запаяна мікропіпетка, 2 — міоцит. Б — флуоресцентна мікроскопія Ca^{2+} -відповіді міоцита: 1 — до стимуляції, 2 — під час натискання, 3 — відновлення після завершення стимуляції.

1.4 Полімеразна ланцюгова реакція для дослідження експресії мРНК Piezo1

За допомогою методу ПЛР та подальшого перенесення зразків на агарозний гель можна наочно побачити експресію мРНК досліджуваних зразків.

Для дослідження був виділений сечовий міхур, частково очищений від жирового шару, подрібнений та поміщений у транспортне середовище. Після приблизно доби знаходження у транспортному середовищі, була отримана суспензія із повністю розчиненими твердими

зразками сечового міхура. Далі з цієї суспензії за допомогою стандартного набору для виділення була отримана інша суспензія із виділеною РНК. Далі суспензія була аліквотована і поміщена в ампліфікатор, де методом ПЛР були отримані амплікони із матеріалом, за попередньою гіпотезою із ампліфікованим мРНК Piezo1. Далі був приготовлений агарозний гель і проведений метод електрофорезу НК. Результат експерименту зображений на рисунку 2.9.

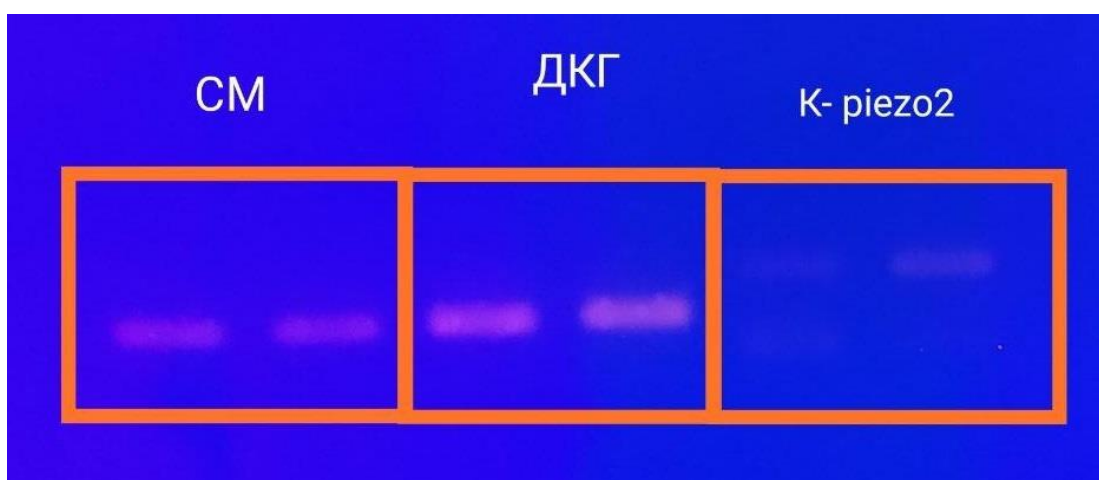


Рисунок 2.9 – Результати ПЛР та гель-електрофорезу. СМ – сечовий міхур, ДКГ – дорсальні корінцеві ганглії, K-piezo2 – перевірка праймера.

Як можна побачити на рисунку, маємо рух РНК по гелю у полі СМ, що свідчить про те, що праймери спрацювали, і мРНК Piezo1 присутня у сечовому міхурі. Відповідь не така яскрава бо, скоріше за всього, була взята мала концентрація із суспензії із органом для проведення ампліфікації.

Отже, наступним кроком у дослідженні буде налагодження методу Single-cell PCR, аби протестувати відокремлені виділені міоцити детрузора на експресію у них мРНК досліджуваного каналу.

Це ставить перед нами інженерну задачу для побудови приладу, що дозволить відокремлювати поодинокі клітини із загальної суспензії

обробленої тканини, аби виділити окремі міоцити без «клітинного сміття», залишків жирової тканини, власне жирових клітин і т.д.

1.5 Розробка приладу для проведення Single-Cell-PCR

Отже, було прийняте рішення розробити та спроектувати прилад для маркування клітин специфічними частинками (магнітними або флуоресцентними) для відділення клітин від сміття та комфортного виявлення та перенесення із загальної суспензії клітин до суспензії для ПЛР.

Було почате проектування приладу, створені 3Д-моделі базових елементів конструкції, які потрібно буде виготовити з пластику на 3Д-принтері (рис. 2.10).

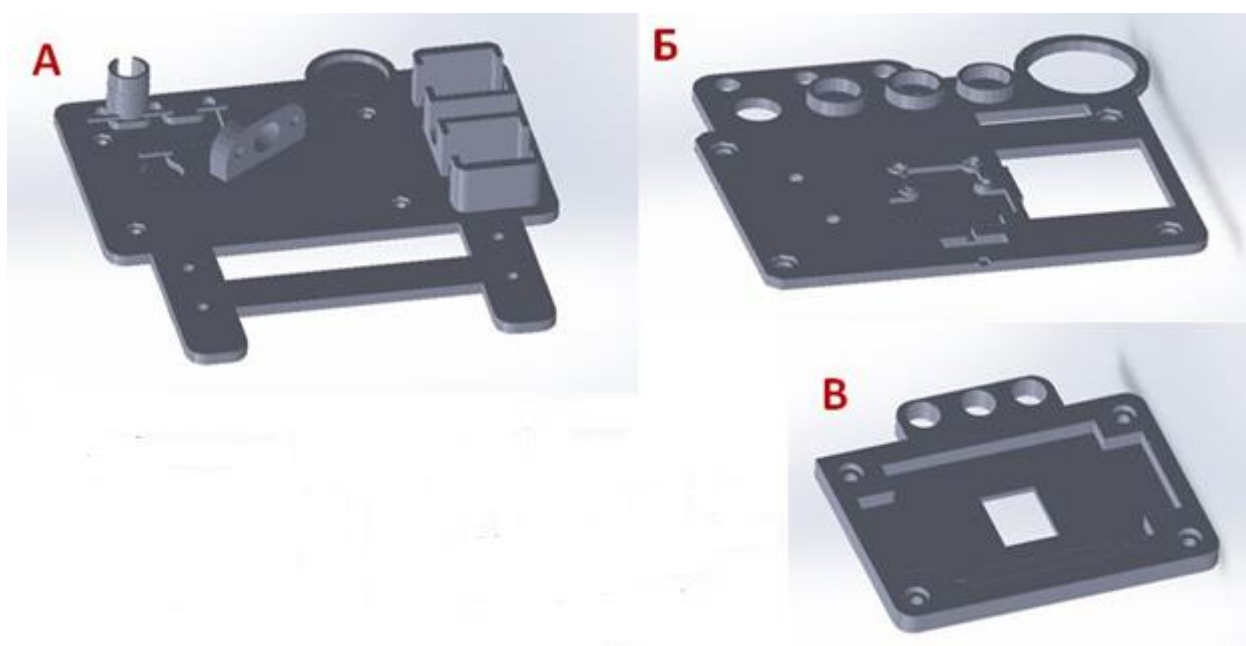


Рисунок 2.10 – Набір зображень із 3Д-моделями конструкції приладу (А, Б, В).

Після моделювання компонентів каркасу, моделі були відправлені на 3Д-друк.

Далі, після того, як були придбані усі інші компоненти, необхідні для збірки приладу, був початий процес поєднання компонентів. Варто додати, що при моделюванні частин корпусу усі функціональні виїмки та пази були розраховані для певних конкретних моделей інших деталей, але у процесі купівлі елементів багато з них виявились трохи іншими, ніж вказувалося у технічних листах.

По-перше, були переплавлені фітинги для силіконових трубок, аби правильно фіксуватись у виділені для них виїмки (рис. 2.11).



Рисунок 2.11 – Підготовлені фітинги

Далі був виконаний перший з задуманих елементів для перекачки розчинів (рис. 2.12).



Рисунок 2.12 – Виготовлення одного зі з'єднань у приладі.

Наступним кроком була підготовка крокового двигуна, який потрібен аби розкручувати магніт над трубкою, по якій за задумом буде йти розчин із магнітними частинками (рис. 2.13). Надрукована на 3Д-принтері деталь була приєднана до двигуна клеєм та ізолентою. Далі у цю деталь поміщувався магніт. Підготовлений двигун був приєднаний на відведену для нього деталь.



Рисунок 2.13 – Підготовка крокового двигуна

Як було вказано раніше, при збірці приладу виявилось, що деякі із замовлених деталей не відповідали за параметрами до вказаних. Отже, для встановлення насосів були змодельовані спеціальні виїмки, які у процесі монтажу виявилися занадто малими, тому виявилось потрібним вручну переплавляти стінки виїмок. Далі насоси були поміщені у підготовлені виїмки та під'єднані до системи трубок (рис. 2.14).



Рисунок 2.14 – Підготовка виїмок та під'єднання насосів

Наступним була підготовлена інша частина з'єднань (рис. 2.15).



Рисунок 2.15 – Підготовка з'єднань

Далі були виконані збірки другого та третього поверхів конструкції із підготовкою наступних з'єднань трубок для переливання розчинів. Також були встановлені пробірки, з яких потім насосами будуть забиратися розчини та з'єднуватись в одному каналі (рис. 2.16).

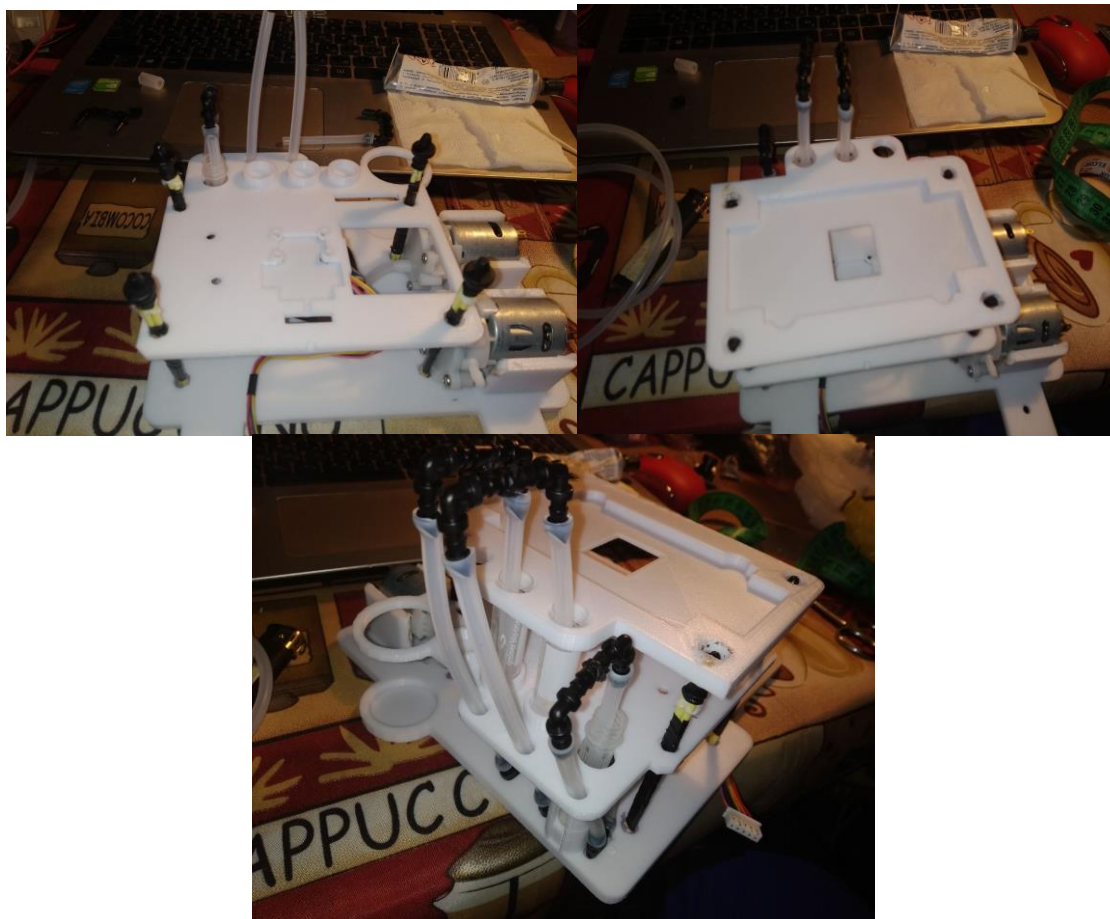


Рисунок 2.16 – Встановлення другого та третього рівня конструкції.

Наостанок, були під'єднані насоси до загального каналу, де мають зустрітися різні розчини та суспензії, а також було встановлено фалькон, куди має зливатися остаточний розчин з клітинами та частинками. Крім цього, на корпус встановлена плата Arduino та монтажна плата, до яких мають під'єднуватися усі електротехнічні елементи (рис. 2.17).

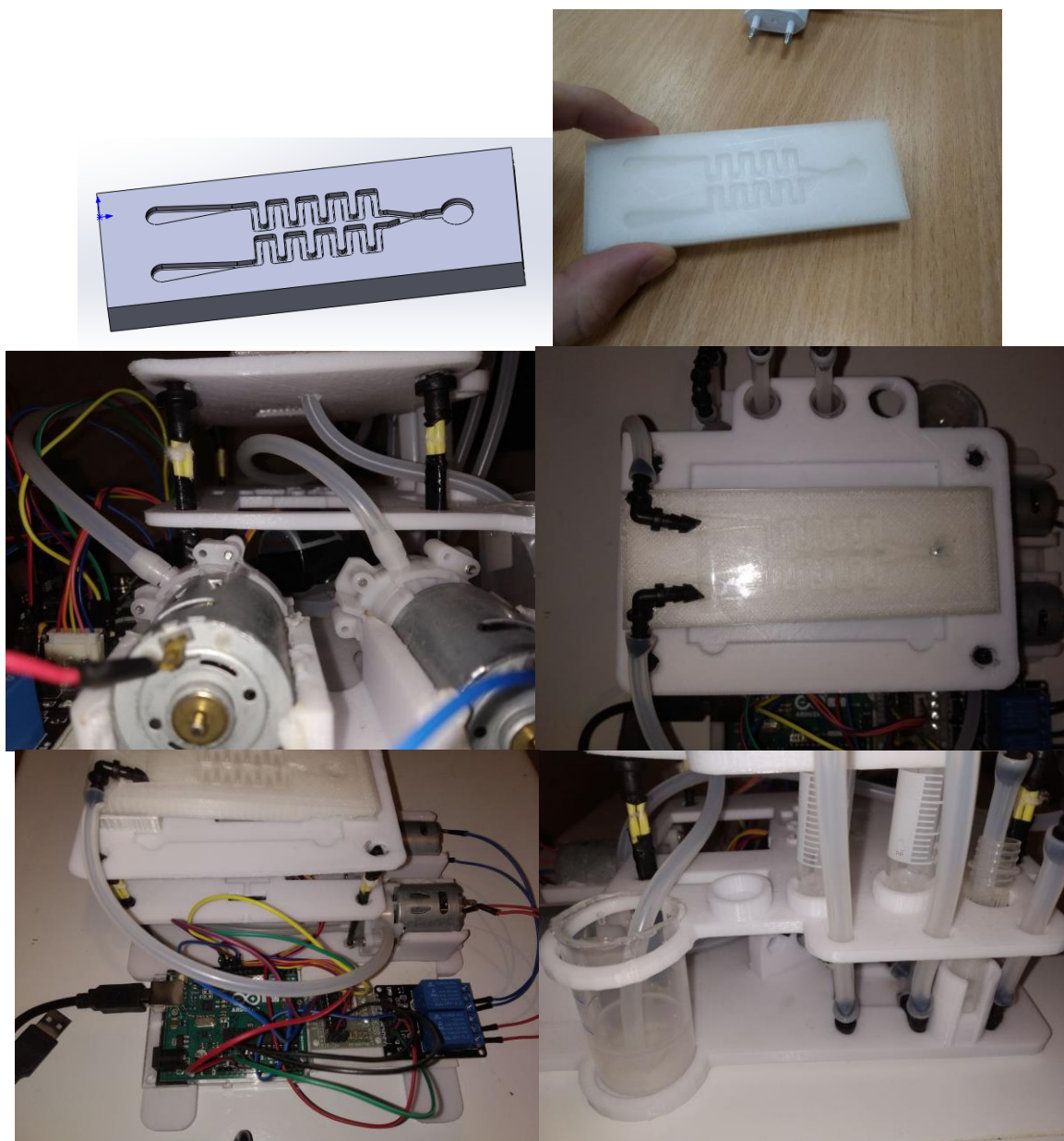


Рисунок 2.17 – Фінальні з'єднання трубок та приєднання до корпусу програмних плат.

Далі, потрібно під'єднати насоси та кроковий двигун до плати Arduino. Для цього були використані наступні макети схем та коду (рис. 2.18, рис. 2.19).

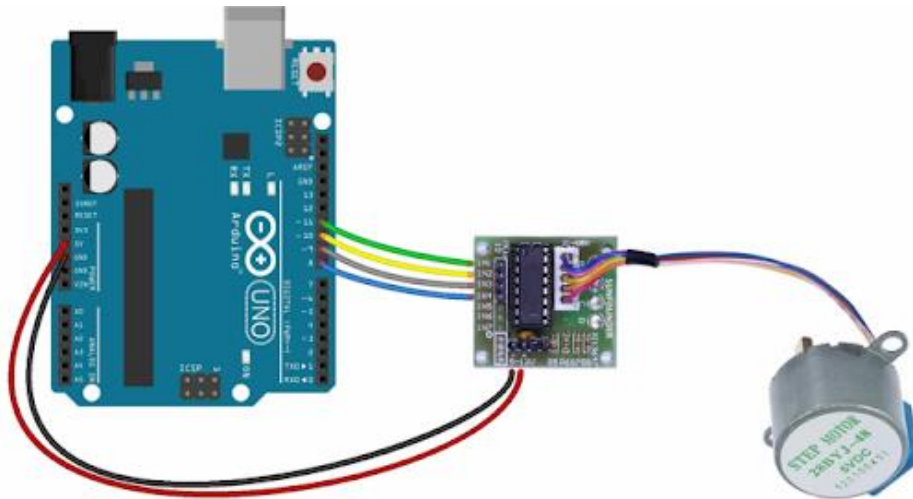


Рисунок 2.18 – Схема підключення крокового двигуна до плати. В даному випадку потрібно підключити двигун через спеціальний драйвер

Лістинг програми:

```
#define in1 8
#define in2 9
#define in3 10
#define in4 11
int dl = 2;
void setup() {
    pinMode(in1, OUTPUT);
    pinMode(in2, OUTPUT);
    pinMode(in3, OUTPUT);
    pinMode(in4, OUTPUT);
}
void loop() {
    digitalWrite(in1, HIGH);
    digitalWrite(in2, LOW);
    digitalWrite(in3, LOW);
    digitalWrite(in4, HIGH);
    delay(dl);
```



```

digitalWrite(in1, HIGH);
digitalWrite(in2, HIGH);
digitalWrite(in3, LOW);
digitalWrite(in4, LOW);
delay(dl);
digitalWrite(in1, LOW);
digitalWrite(in2, HIGH);
digitalWrite(in3, HIGH);
digitalWrite(in4, LOW);
delay(dl);
digitalWrite(in1, LOW);
digitalWrite(in2, LOW);
digitalWrite(in3, HIGH);
digitalWrite(in4, HIGH);
delay(dl);
}

```

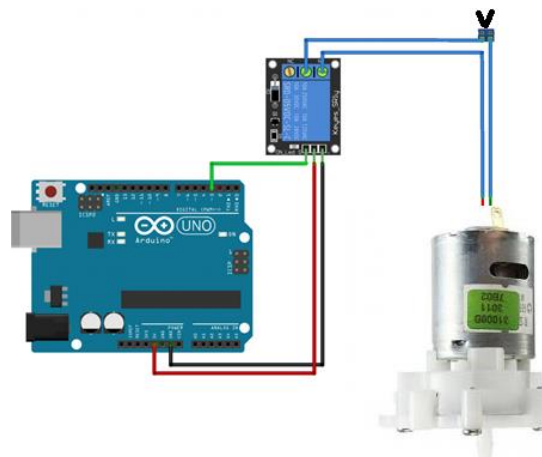


Рисунок 2.19 – Підключення насоса до плати. В даному випадку насос під'єднується до реле

Після підключення усіх необхідних компонентів система була протестована на практиці у лабораторії.

Були підготовлені мікрометрові частинки та суспензія із клітинами (рис. 2.20).

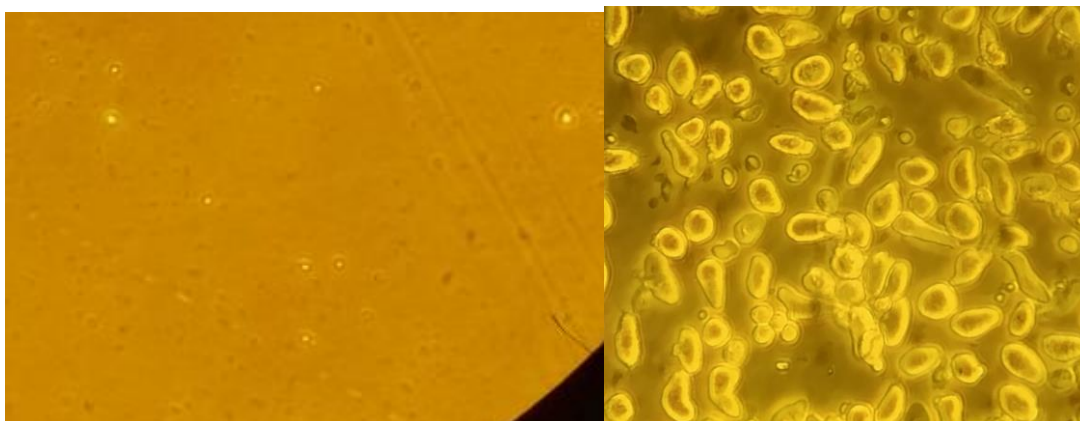


Рисунок 2.20 – Мікрометрові частинки (зліва) та суспензія з клітинами (справа)

За допомогою сконструйованого приладу було проведено переливання суспензії з клітинами через силіконові канали, таким чином проганяючи розчин з клітинами та сміттям, поєднанням їх з мікрочастинками, що відміло певну кількість тканинного сміття та дозволило отримати чистіші клітини для проведення подальшого експерименту.

Отже, оброблені таким чином клітини використали для проведення Single-Cell-PCR для дослідження наявності мРНК Piezo1 у міоцитах детрузора щура (рис. 2.21).

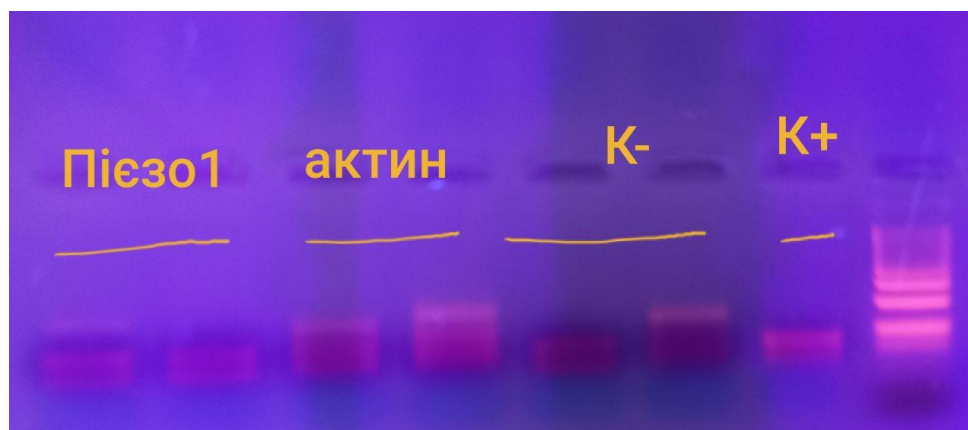


Рисунок 2.21 – Проведення ПЛР та методу гел-електрофорезу

Мала світність у області з Piezo1 свідчить відповідно про малу копійність нуклеїнових кислот, що зумовлене або неправильною постановкою експерименту із низькою концентрацією введених ампліконів, або все ще про наявність залишкових елементів інших тканин сечового міхура, отже і про відсутність мРНК шуканого каналу у міоцитах. Тим не менш, відпрацьована методика виділення та ізоляції клітин є робоча, то надалі потрібно проводити повторні експерименти.

Висновок до розділу 2

У даному розділі описані об'єкт, матеріали та методи дослідження. Зображена також сконструйована система для стимуляції клітин гідродинамічним тиском. Із новою системою механічного впливу на клітину були у серії експериментів отримані відповіді клітин на активацію, що свідчить про успішність експериментів.

Також були проведені експерименти із візуалізацією кальцієвої відповіді на активацію клітин дотиком. Експерименти також показали наявність позитивної відповіді-реакції, тобто механічну чутливість.

Був проведений експеримент із постановкою полімеразної ланцюгової реакції та використання гель-електрофорезу для визначення експресії мРНК Piezo1 у сечовому міхурі. Позитивна відповідь на наявність мРНК у цілісному органі привела до вирішення зробити у подальшому ПЛР у конфігурації Single-cell, для чого був розроблений прилад, що дозволяє проганяти суспензію з клітинами для отримання більш якісного розчину з ізольованими клітинами. Отримані результати експериментів, що потребують інтерпретації та додаткових повторних експериментів.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЕКТУ

3.1 Резюме проекту

Сучасний стан науки та практичної освіти в Україні є досить поганим в контексті можливостей, які наявні для спеціалістів та молодих дослідників для реалізації своїх теоретичних ідей та створення нових технологій. В навчальних закладах різних спеціальностей або відсутнє, або в наявності лише мала кількість одиниць спеціалізованого обладнання, яке мало б надавати студентам практичні навички проведення досліджень або яке студенти могли б використовувати для того, щоб перевіряти на практиці свої ідеї, якими б незначними вони не здавалися. На своєму досвіді було визначено, що для проведення певних специфічних досліджень студентам потрібно окремо звертатися до людей, відповідальних за обладнання, при цьому досвід показує, що таке обладнання в навчальних закладах ірраціонально сприймається як щось занадто цінне (через реальну високу ціну), до чого потрібно максимально обмежувати доступ. Фактично, якщо немає ніяких організованих та структурованих програм для надання практичних навичок студентам у спеціалізованих галузях, то молоді спеціалісти не мають змоги реалізувати свої ідеї. В практиці наукового ж процесу на даний момент зберігається ситуація, коли спеціалісти з різних сфер та відділів мають також шукати місце досліджень (навіть на етапі перевірки ідеї базовими технологічними методами), при цьому цей процес супроводжується витратами часу та не є оптимізованим; обладнання на всіх також не вистачає.

Даний проект є унікальним на вітчизняному ринку, оскільки потенційно дозволить обладнати навчальні заклади та деякі наукові установи приладами бюджетного сегменту для підготовки суспензій клітин. Для створення мінімально життєздатної версії продукту необхідно 2 роки та фінансування, яке

покриє витрати на розробку, виготовлення обладнання, а також розробку та створення ПЗ та середовища для підтримки та спілкування з користувачами.

3.2 Організація проекту

Реалізація проекту планується на базі Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України. Створення мінімально життєздатного продукту планується до кінця грудня 2020 року. Результати проекту можуть використовуватися студентами навчальних закладів та спеціалістами-науковцями наукових установ.

3.3 Ключові види діяльності проекту

Вид проекту за характером інновації

– дослідно-конструкторська та дослідно-технологічна робота, забезпечення доступу студентів та дослідників різних спеціальностей до обладнання; досвід запуску продукту

Спрямованість проекту:

- випуск продукції, що надає доступ до ефективного навчання та досліджень, реалізації наукових проектів;
- випуск продукції, конкурентоспроможної на вітчизняному ринку
- оновлення вітчизняної технологічної бази
- збільшення продуктивності та поліпшення умов праці

Висновок щодо науково-технічного рівня ідеї:

- продукт, близький за якості результатів із повноцінним сертифікованим обладнанням;
- немає аналогів в Україні: на вітчизняному ринку відсутній продукт або послуга для полегшення наукових та студентських досліджень.

Таблиця 3.1. Основні бізнес-процеси проекту

Група процесів	Бізнес-процес	Ступінь опрацювання бізнес-процесу	
		є реалізованим	буде реалізованим
Розробка продукції	розробка та конструювання продукції	Розробка та конструювання продукту	Розширення спектру продукції та створення сервісу для підтримки споживачів
Вимоги споживачів	дослідження розвитку ринку	Знаходження вузької ниші ринку, на основі чого створюється продукт	Аналіз ринку для подальшого задоволення потреб споживачів
	організація маркетингу і продажів		Реалізація в майбутньому
	тендерне розміщення замовлень		Реалізація в майбутньому
Виконання замовлень	забезпечення і матеріально-технічний збут		Реалізація в майбутньому
Обслуговування споживача	післяпродажне обслуговування		Реалізація в майбутньому
	повернення продукції		Розгляд цього питання

3.4 Ціннісні пропозиції та споживачі

Характер формування споживчої цінності проекту: здешевлення задоволення існуючих потреб: для студентів та наукових співробітників існує потреба базових досліджень матеріалів, яка може бути в умовах вітчизняних реалій реалізована лише за наявності в тих чи інших закладах контактних баз із дороговартісним обладнанням, доступ до яких може і не бути отриманий.

Таблиця 3.2. Зміст ідеї проекту

Зміст ідеї	Напрямки застосування	Сегменти споживачів	Цінність для споживачів
Надання доступу до ефективних базових досліджень матеріалів в різних галузях науки і техніки	Студентська дослідницька робота	Студенти	Можливість навчатися практично, проводячи актуальні дослідження, отримання досвіду з певних питань
	Науково-дослідницька роботи	Спеціалісти -науковці за різними напрямками	Можливість проведення своїх досліджень (в тому числі і серйозного рівня) на більш простішому обладнанні, результати якого можуть бути ефективними і

			аргументованими для повторення досліджень в інших закладах на серйозному обладнанні
--	--	--	--

Таблиця 3.3. Аналіз ідеї проекту

	Техніко- економічні характери- тики ідеї	Продукція конкурентів		W (слабка сторона)	N (нейтральна сторона)	S (сильна сторона)
		Мій проект	Конкуренти (Світові виробники стаціонарного обладнання)			
.	Виконання прямої функції: проведення дослідження з галузі	+	+	Менша точніст ь результ атів	Існування аналогічної продукції (але дорого вартісної)	Висока доступніст ь
.	Висока доступність	+	-	-	-	Висока доступніст ь
.	Постійна клієнтська підтримка та часте	+	-	-	Існування простої підтримки	Швидке реагування та допомога

	оновлення продукції					
.	Ринок збуту	Україна	Світ	Менша точність результатів	Вузька ніша в ринку	Потенційно широкі можливості для реалізації

Сильна сторона проекту – його доступність та унікальність на ринку України, оскільки навчальні заклади та невеликі наукові проекти або зовсім не мають власного обладнання, або мають декілька одиниць специфічної продукції, доступ до яких обмежений через «велику цінність» продуктів; абстрактно – будь хто не зможе скористатися обладнанням, якщо відповідальні за це особи не нададуть доступу до нього, що зупиняє науково-технічний розвиток та реалізацію молодих зацікавлених спеціалістів.

Таблиця 3.4. Технологічний аудит ідеї проекту

	Ідея проекту	Технології її реалізації	Наявність технологій	Доступність технологій
.	Створення продукту для досліджень	Виготовлення продукції	Реалізовано	Доступна
	Створення програмного забезпечення для продукту	Розробка та створення ПЗ для використання; ПЗ для аналізу та інтерпретації результатів	Відсутня, необхідна розробка з нуля	Доступна

.	Створення середовища для підтримки клієнтів та інформаційної бази	Написання коду для створення сервісу	Відсутня, необхідна розробка з нуля	Доступна
Обрана технологія реалізації ідеї проекту: виробництво обладнання для досліджень бюджетного сегменту				

За результатами аналізу технологічного здійснення ідеї проекту, можемо зробити висновок, що реалізація проекту можлива.

Таблиця 3.5. SWOT-аналіз проекту

<p>Сильні сторони (S):</p> <ul style="list-style-type: none"> – Унікальність пропозиції; – Доступність продукції; – Постійна підтримка споживачів; – Реакція на ринок, що розвивається; 	<p>Слабкі сторони (W):</p> <ul style="list-style-type: none"> – Необхідність використання додаткового програмного забезпечення; – Можлива «неідеальність» результатів у порівнянні із світовими спеціалізованими виробниками;
<p>Можливості (O):</p> <ul style="list-style-type: none"> – Можливість студентам та фахівцям проводити дослідження за їх потребами та бажаннями; – Можливість розширення 	<p>Загрози (T):</p> <ul style="list-style-type: none"> – Критика виробників та поставників продукції, яка є основною на ринку; – Як наслідок – проблеми в

сфери використання; – Можливість створення спеціалізованого сервісу для користувачів;	сприйнятті продукції людьми, які відповідальні за фінансову сторону забезпечення своїх закладів, але які не є прямими дослідниками (незважаючи на високу доступність)
--	---

3.5 Взаємовідносини зі споживачами та канали збуту

Таблиця 3.6. Взаємодія зі споживачами

	Сегмент споживачів	Особливості поведінки	Вимоги споживачів	Канали збуту	Інші аспекти взаємовідносин
.	Навчальні заклади	Надання унікальної в наших реаліях можливості навчатися практично	- точність результатів - постійна підтримка;	Прямі канали збуту	Клієнтська підтримка; можливе проведення спеціальних заходів для обміну інформацією
.	Лабораторії та дослідницькі центри	Можливість доступних первинних необхідних досліджень	- широка доступність		Тісна співпраця; реакція на проблеми та потреби; організація допомоги у «верифікації» даних

3.6 Обґрунтування ресурсів та витрат проекту

Таблиця 3.7. Визначення ціни

	Рівень цін на товари- замінники	Рівень цін на товари-аналоги	Рівень доходів цільової групи споживачів	Верхня та нижня межі встановлення ціни на продукцію
.	1000\$ та набагато вище	відсутні	170\$-420\$	100\$-350\$

Таблиця 3.8. Визначення обсягу виробництва продукції.

Показник	Значення по роках				
	2019	2020	2021	2022	2023
Можлива річна кількість користувачів	-	100	250	400	550
Ціна одиниці продукції (тис. грн.)	-	3,5	4,5	6	8
Річні обсяги надання послуг в вартісних показниках (тис. грн.)	-	345	575	920	1150

Таблиця 3.9. Розрахунок загальних початкових інвестиційних витрат

	Назва етапу	Терміни виконання	Обсяги фінансування, \$
.	Проведення досліджень	2019-2020	1000

.	Розробка технології	2020	1000
.	Придбання матеріалів	2020-2021	2000
.	Організація діяльності та запуск проекту	2021	3000
.	Витрати на управління	2021-2022	2000
.	Початкові виробничі витрати	2022	5000
.	Інші витрати	-	-
Разом			14 000

Таблиця 3.10. Розрахунок виробничих витрат

з/п	Стаття витрат	Сукупні витрати за період, \$				
		2019	2020	2021	2022	2023
.	Загальногосподарські витрати					
.1.	витрати на оренду та утримання приміщень, обладнання	700	700	700	700	700
.2.	комунальні витрати	400	400	400	400	400
.5.	витрати на збут, просування та рекламу	500	600	600	700	700
.	Витрати на матеріальні ресурси (комплектуючі, сировина)	2000	2000	2000	3000	3000

.	Витрати на оплату праці	700	700	1000	1000	1000
.	Інші витрати (якщо є)	-	-	-	-	-
	Разом:	4300	4400	4700	5800	5800

Таблиця 3.11. Розрахунок загальних витрат на реалізацію проекту по роках

Показник	Значення по роках					Разом
	2019	2020	2021	2022	2023	
Інвестиційні витрати	1000	2000	2500	3500	3500	14000
Виробничі витрати	4300	4400	4700	5800	5800	25000
Обсяг загальних витрат, в тому числі за рахунок	5300	6400	7200	9300	9300	39000
— власних коштів	0	0	2000	2000	4000	8000
— коштів інвестора	5300	6400	5200	6300	5300	31000

3.7 Грошовий потік та оцінка вартості проекту

Таблиця 3.12. Формування грошового потоку від реалізації проекту

Показник	Значення по роках					Разом
	2019	2020	2021	2022	2023	

.	Надходження від проекту (D)	-	15000	25000	40000	50000	130000
.	Загальні витрати (див. п. 7.5) (I), в тому числі	5300	6400	7200	9300	9300	39000
.	Грошовий потік (3 = 1 – 2) (CF)	-5300	8600	17800	30700	40700	92500

Таблиця 3.13. Розрахунок вартості проекту

Найменування методу	Умови застосування	Отримана оцінка	Частка венчурного інвестора	Рішення щодо інвестування в проект
ROV-метод	Ставка 20%	60	15%	доцільно
Метод «хокейної ключки»	Ріст компанії доходів у 3.3 рази у період 54 років	85%	40%	недоцільно

На основі наведених вище оцінок можна зробити висновок, що реалізація запропонованого стартапу є доцільною як для автора проекту так і для інвесторів. Продукт займатиме вузьку нішу на ринку, але він є соціально-потрібним.

Висновки до розділу 3

У даному стартап-проекті проведено оцінку існуючого ринку (відсутність подібних послуг на ринку для споживачів), описано ключових споживачів (студенти та спеціалісти-науковці) та типи взаємодії з майбутніми клієнтами (постійна підтримка, швидка реакція на проблеми та потреби клієнтів), описано необхідні етапи та кількість інвестицій для реалізації проекту та можливостей для майбутнього розвитку проекту. Проаналізовано доцільність створення даного проекту та вкладення в нього інвестицій.

ВИСНОВКИ

Темою магістерської дисертації є: «Експресія та функції йонного каналу Piezo1 у міоцитах детрузора щура».

В ході роботи опрацьована література, що стосується механочутливості та досліджень іонних каналів та електрофізіологічних методів, а також методів кальциметрії та ПЛР.

Були проведені необхідні електрофізіологічні експерименти з дослідження механочутливості гладеньких міоцитів. В результаті дослідження отримали і зареєстрували механо-індуковану відповідь гладенького міоцита детрузора на гідродинамічний тиск. Були проведені також експерименти із візуалізацією кальцієвої відповіді. Результати досліджень підтверджують те, що м'язова тканина детрузора дійсно чутлива до механічних подразників. Було проведено дослідження методом ПЛР, що підтвердило наявність експресії мРНК Piezo1 у сечовому міхурі. Розроблений прилад, що дозволяє підготувати клітини до проведення досліджень над окремою групою.

Результати досліджень показують, що необхідно провести подальші експерименти у конфігурації Single-cell-ПЛР, використовуючи розроблений прилад.

Метою даної роботи було дослідження експресії та функцій каналу Piezo1 у міоцитах детрузора щура.

Для досягнення мети сформовані та виконані такі завдання:

1. Провести огляд літературних джерел, що описують дослідження клітин фізіологічними методами; проаналізувати літературні джерела, що стосуються досліджень механочутливості тканин сечового міхура.

2. Провести електрофізіологічні досліді із гідродинамічної активацією клітин, провести кальциметричні досліді із активацією клітин дотиком.

3. Провести дослідження із застосуванням методу ПЛР та розробити прилад для забезпечення проведення Single-cell-ПЛР.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*. 2016 Sep 23;87(6):1162–79.
2. Wang S, Chennupati R, Kaur H, Iring A, Wettschureck N, Offermanns S. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. 2016 Sep 22;126(12):4527–36.
3. Takayama Y, Suzuki Y, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M. Functional Role for Piezo1 in Stretch-evoked Ca^{2+} Influx and ATP Release in Urothelial Cell Cultures. *Jor of bio chem*. 2014 Jun 6;289(23):16565–75.
4. Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z. Piezo2 is required for Merkel cell mechanotransduction. *Nature*. 2014 May 29;509(7502):622–6.
5. Volkers L, Mechoukhi Y, Coste B. Piezo channels: from structure to function. *Pflugers Arch*. 2015 Jan;467(1):95-9.
6. Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch , Tension , and Transduction – The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci* [Інтернет]. 2016;xx:1–15. Доступ за посиланням: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.004> (Дата звернення - 01.11.2020)
7. Syeda R, Xu J, Dubin AE, Coste B, Mathur J, Huynh T, et al. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. 2015 Jun 5;1–11.
8. Murthy SE, Dubin AE, Patapoutian A. Piezos thrive under pressure: in health and disease. *Nat Publ Gr* [Інтернет]. 2017 Oct 6; (12):771-783. Доступ за посиланням: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.92> (Дата звернення - 01.11.2020)
9. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically-activated cation channels. 2010 Oct 1;330(6000):55–60.
10. Everaerts W, Sepúlveda MR, Gevaert T, Roskams T, Nilius B, Ridder DD. Where is TRPV1 expressed in the bladder , do we see the real channel? 2009 Jan 20;421–5.
11. Chalfie M. Neurosensory mechanotransduction. 2009 Jan;10:44–52.

12. Bazopoulou D, Tavernarakis N. Mechanosensitive Ion Channels in *Caenorhabditis elegans*. Vol 59, Part B. Elsevier Masson SAS; [Інтернет]. 2007. 49-79 p. Доступ за посиланням: [http://dx.doi.org/10.1016/S1063-5823\(06\)59003-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1063-5823(06)59003-9) (Дата звернення - 01.11.2020)

13. Moe P, Blount P. Assessment of Potential Stimuli for MechanoDependent Gating of MscL: Effects of Pressure, Tension, and Lipid Headgroups. 2005 Jul 18;12239–44.

14. Zhao Q, Wu K, Geng J, Chi S, Wang Y, Zhi P, et al. Ion Permeation and Mechanotransduction Mechanisms of Mechanosensitive Piezo Channels Article Ion Permeation and Mechanotransduction Mechanisms of Mechanosensitive Piezo Channels. *Neuron* [Інтернет]. 2016 May 28;1–16. Доступ за посиланням: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.046> (Дата звернення - 01.11.2020)

15. Shin J, Adams D, Paukert M, Siba M, Sidi S, Levin M, et al. *Xenopus* TRPN1 (NOMPC) localizes to microtubule-based cilia in epithelial cells, including inner-ear hair cells. 2005 Aug 30;102(35):12572–7.

16. Brohawn SG. How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2015;1352:20–32.

17. Brohawn SG, Su Z, Mackinnon R. Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *PNAS*; 2014;111(9).

18. Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, et al. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO Jor.* 2004;23(13):2684–95.

19. Alloui A, Mamet J, Noe J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, et al. TREK-1, a K channel involved in polymodal pain. *EMBO Jor.* 2006;25(11):2368–76.

20. Dong YY, Pike ACW, Mackenzie A, Mcclenaghan C, Aryal P, Dong L, et al. K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science.* 2015 Feb 26;347(6227).

21. Milac A, Anishkin A, Fatakia SN, Chow CC, Guy HR, Milac A, et al. Structural models of TREK channels and their gating mechanism. *Channels*. 2011 Jan;6950.
22. Josefina del Marmol, Robert A. Rietmeijer SGB. Chapter 11. Studying Mechanosensitivity of Two-Pore Domain K⁺ Channels in Cellular and Reconstituted Proteoliposome Membranes. *Methods Mol Biol*. 2018;1684:129–50.
23. Hanukoglu I, Hanukoglu A, Aviv T. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure- function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*; 2017 April 1; 579(2): 95–132.
24. Bhalla V, Hallows KR. Mechanisms of ENaC Regulation and Clinical Implications. *J Am Soc Nephrol*; 2008;1845–54.
25. Fronius M, Clauss WG. Mechano-sensitivity of ENaC : may the (shear) force be with you. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*; 2008;775–85.
26. Chatzigeorgiou M, Yoo S, Watson JD, Lee W, Spencer WC, Kindt KS, et al. Specific roles for DEG / ENaC and TRP channels in touch and thermosensation in *C. elegans* nociceptors. *Nat Publ Gr* [Інтернет]. 2010;13(7):861–8. Доступ за посиланням: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2581> (Дата звернення - 01.11.2020)
27. Hummler E. The ENaC Channel is Required for Normal Epidermal Differentiation. *J Invest Dermatol* [Інтернет]. 2002;118(4):589–94. Доступ за посиланням: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01721> (Дата звернення - 01.11.2020)
28. Rossier BC. Mechanosensitivity of the Epithelial Sodium Channel (ENaC):Controversy or Pseudocontroversy? *J. Gen. Physiol*. 1998 Aug;112(August):2–3.
29. Kashlan OB, Kleyman TR. ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member. *J Physiol Renal Physiol*. 2011;15261:684–97.
30. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Nil Ow Gen Bio*. 2011; 12:218.

31. Zhao R, Tsang SY, Kong H, Kong H, Tsang SY, Man M, et al. Versatile Roles of Intracellularly Located TRPV1 Channel . *Journal of Cellular Physiology*. 2016 Nov 22; 1-46 p.
32. Lee J, Moon S, Cha Y, Chung YD. *Drosophila* TRPN (= NOMPC) Channel Localizes to the Distal End of Mechanosensory Cilia. *Plos One*. 2010;5(6).
33. Walker RG. *Drosophila* Mechanosensory Transduction Channel. 2000 March;287(3):20–5.
34. Zhang W, Yan Z, Jan LY, Jan YN. Sound response mediated by the TRP channels NOMPC , NANCHUNG, and INACTIVE in chordotonal organs of *Drosophila* larvae. *Pnas*. 2013 Aug 12;110(33): 13612–13617.
35. Jin P, Bulkley D, Guo Y, Zhang W, Guo Z, Huynh W, et al. Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC. *Nat Publ [Интернет]*. 2017;547(7661):118–22. Доступ за посиланням: <http://dx.doi.org/10.1038/nature22981> (Дата звернення - 01.11.2020)
36. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat genetics*. 2003 February;33(2):129–37.
37. Satoh K, Hata M, Takahara S, Tsuzaki H. A novel membrane protein , encoded by the gene covering KIAA0233 , is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes. *Brain research*. 2006;8: 19 – 27.
38. Spencer KS, Kim SE, Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*. 2012 Mar 8; 483: 176-183.
39. Gnanasambandam R, Bae C, Gottlieb PA, Sachs F. Ionic Selectivity and Permeation Properties of Human PIEZO1 Channels. *Plos ONE*. 2015 May 8:1–16.
40. Lewis AH. Mechanical sensitivity of Piezo1 ion channels can be tuned by cellular membrane tension. *Neuroscience*. 2015 Dec 8;12088: 1–17.
41. Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, Whitwam T, Patapoutian A, Ward AB. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nat Publ Gr [Интернет]*. 2017;1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature25453>

42. Cox CD, Bae C, Ziegler L, Hartley S, Nikolova-krstevski V, Rohde PR, et al. tension. *Nat Commun* [Интернет]. 2016;7:1–13. Доступ за посиланням: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10366> (Дата звернення - 01.11.2020)

43. Ge J, Li W, Zhao Q, Li N, Chen M, Zhi P, et al. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature*. 2015 Jan: 1-8.

44. Coste B, Murthy SE, Mathur J, Schmidt M, Mechoukhi Y, Delmas P, et al. dictated by C-terminal region. *Nat Commun* [Интернет]. 2015;6(May):1–11. Доступ за посиланням: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8223> (Дата звернення - 01.11.2020)

45. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, et al. *NIH Public Access*. 2011;330(6000):55–60.

46. Ogden D., Stanfield P., Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording/ Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook. The Company of Biologists Ltd, Cambridge (UK)/ 1987/ 53-78 p.

47. Michishita M, Yano K, Tomita K, Matsuzaki O, Kasahara K. Piezo1 expression increases in rat bladder after partial bladder outlet obstruction : веб-сайт. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.10.017> (дата звернення: 01.11.2020).

48. Takayama Y, Suzuki Y, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M. Functional Role for Piezo1 in Stretch-evoked Ca²⁺ Influx and ATP Release in Urothelial Cell Cultures. *Journal of biology and chemistry*. 2014 Jun 6; 289(23):16565–16575.

49. Romero LO, Cordero-morales JF, Va V. Posters : Mechanosensation: веб-сайт. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.639> (дата звернення: 01.11.2020).

50. Wang Zheng, Elena O Gracheva, Sviatoslav N Bagriantsev. A hydrophobic gate in the inner pore helix is the major determinant of inactivation in mechanosensitive Piezo channels : веб-сайт. URL: <https://elifesciences.org/articles/44003> (дата звернення: 01.11.2020).

51. UCI Faculty websites. Solution preparation[Internet]. University of California, Irvine; 2013 Available from:

<http://faculty.sites.uci.edu/chem11/files/2013/11/RDGsolnprep.pdf>. (дата звернення: 01.11.2020).

52. Orme N, Milo R, Phillips R. Cell biology by the numbers.GS Taylor&Francis Group; 2015. 391 p.
53. Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriev Y V, Kurapeev DI, Vlasov TD. Myocardial protection against global ischemia with Krebs-Henseleit buffer-based cardioplegic solution. J Card Sur. 2013;8(60):1–9.
54. Philyppov IB, Paduraru ON, Gulak KL, Skryma R. TRPA1-dependent regulation of bladder detrusor smooth muscle contractility in normal and type I diabetic rats. J Sm Mus Res. 2016;52:1–17.
55. Salamone M, Saladino S, Pampalone M. Tissue Dissociation and Primary Cells Isolation Using Recombinant Collagenases Class I and II. Chem Eng Trans. 2014;38:247–52.